الدليل المعملي لعزل وتعريف ممرضات الطيور

A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens

الجزء الثاني

لجنة التحرير

ديفيد إ. سواين (الرئيس)
David E. Swayne (Chairman)

جون ر. جليسون
John R. Glisson

مارك و. جاكوود
Mark W. Jackwood

جيمس إ. ب سون
James E. Pearson

ويلي م. ريد
Willie M. Reed

ترجمة

د. عبدا بن ناصر ا لف

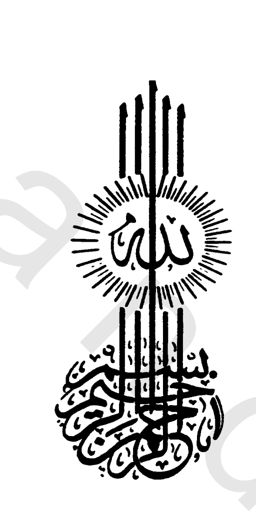
أستاذ أمراض الدواجن المشارك، قسم الطب البيطري،

كلية الزراعة والطب البيطري، جامعة القصيم



النشر العلمي والمطابع - جامعة الملك سعود

ص.ب ٦٨٩٥٣ - الرياض ١١٥٣٧ - المملكة العربية السعودية



هذه ترجمة عربية مصرح بها من قِبل مركز الترجمة بالجامعة لكتاب:

A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens
By: David E. Swayne, John R. Glisson, Mark W. Jackwood, James E. Pearson and Willie M. Reed (Eds.)

فهرسة مكتبة الملك فهد الوطنية أثناء النشر

سواين، ديفيد
الدليل المعملي لعزل وتعريف ممرضات الطيور./ ديفيد سواين؛ عبدالله بن ناصر الخلف.- الرياض، ١٤٣١هـ
٢ مج.
٣١٨ ص، ٢١×٢٨ سم
ردمك: ٨-٦١٧-٥٥-٩٩٦٠-٩٧٨ (مجموعة)
٢-٦١٩-٥٥-٩٩٦٠-٩٧٨ (ج٢)
١- الطيور - أمراض أ. الخلف، عبدالله بن ناصر (مترجم)
ب. العنوان
ديوي ٥٩٨,٢٢ ١٤٣١/٢٦٤٣

رقم الإيداع ١٤٣١/٢٦٤٣
ردمك: ٨-٦١٧-٥٥-٩٩٦٠-٩٧٨ (مجموعة)
٢-٦١٩-٥٥-٩٩٦٠-٩٧٨ (ج٢)

حكمت هذه الترجمة لجنة متخصصة شكلها المجلس العلمي بالجامعة، وقد وافق المجلس العلمي على نشره، بعد اطلاعه على تقارير المحكمين في اجتماعه التاسع للعام الدراسي ١٤٢٩/١٤٣٠هـ المعقود بتاريخ ١٤٣٠/١/٢١هـ الموافق ٢٠٠٩/١/١٨م.



النشر العلمي والمطابع ١٤٣١هـ



مقدمة المترجم

الحمد لله حمداً كثيراً طيباً مباركاً، والصلاة والسلام على حبيبنا وقائدنا محمد بن عبدالله، وعلى آله وصحبه وسلم تسليماً كثيراً، وبعد.

فقد تم الانتهاء من ترجمة هذا الكتاب الذي يعتبر مرجعاً علمياً لكثير من العلماء وطلاب الدراسات العليا في جميع أنحاء العالم، وقد قام كثير من العلماء بالاشتراك في تأليف هذا الكتاب وإخراجه بصورته الحالية، وقد أخذ مني الكثير من الوقت والجهد لترجمته بصورة يستطيع من خلالها طالب العلم في مجالات البحث المعملي في مجال الدواجن أو مجالات الميكروبيولوجيا الأخرى الاستفادة منه بسهولة ويسر.

يحتوي هذا الكتاب على ٤٨ فصلاً تضم معظم الأمراض الهامة التي تصيب الدواجن خاصة، وباقي الطيور عامة، حيث تندرج هذه الفصول تحت أربعة مداخل وهي: المدخل الأول وهو الأمراض والممرضات البكتيرية ويحتوي على ١٦ فصلاً، والمدخل الثاني وهو الأمراض والممرضات الفطرية ويحتوي على فصل واحد، والمدخل الثالث وهو الأمراض والممرضات الفيروسية ويحتوي على ٢٣ فصلاً، والمدخل الرابع والأخير هو طرق القياس المعملية، ويليه جداول خاصة بالتشخيص السريع لأهم أمراض الدواجن.

هذا وأرجو من الله العلي القدير أن يجعل هذا الكتاب فيه خيراً كثيراً لطلاب العلم والعاملين في معامل التشخيص المرضي، وكذلك طلاب الدارسات العليا في كثير من الكليات العلمية.

د. عبدا بن ناصر ا لف



تقديم
PREFACE

إن هذا الدليل نشأ من الحاجة إلى كتاب لتصنيف الطريقة القياسية لاختبار وتقييم لقاحات الدواجن. وقد تبنت الأكاديمية الوطنية للعلومِ النشر الأصلي المعنون بـ *الطرق البيولوجية لفحص الدواجن*، وأكملت منه تنقيحين متعاقبين. وقد قبلت الجمعية الأمريكية لأخصائيي أمراض الطيور (AAAP) (أي أي أي بي) في عام ١٩٧٥م مسؤوليتها للنشر، لكن بسبب تحقيق الحاجة لتوحيد اختبار اللقاحات، اتسع مجال الدليل وغرضه لكي يكون مصدرًا للطرق المخبرية لعزل وتعريف مسببات المرض. وقد تم تغيير عنوان الطبعة الأولى إلى *عزل وتعريف الأسباب المرضية للطيور*، ثم تغير إلى *الدليل المعملي لعزل وتعريف ممرضات الطيور* للطبعة الثالثة. وأصبح الدليل مصدراً للاستعمال اليومي في المختبر التشخيصي. وفي الطبعة الرابعة انتقل التركيز من الدليل الإجرائي لعزل وتعريف الأسباب المرضية إلى دليل أكثر إحاطة لتشخيص المرض وعزل المسبب و/أو إظهار المسبب المرضي. وهذا التغيير كان مطلباً؛ لأن العديد من النماذج السريرية مقدمة كنماذج مجهولة لمعرفة مسببات الأمراض وبعض المسببات المرضية يصعب عزلها، لكن يمكن أن يتم عرضها بتقنيات جزيئية أو علم مناعية حديثة. وقد عينت الجمعية الأمريكية لأخصائيي أمراض الطيور (أي أي أي بي) أربعة أعضاء جدد في لجنة تحرير الطبعة الرابعة بدلاً من لورانس، وتشارلز، ودوميرموث، وجراهام بورشيز. وقد تم تعيين كل من جون جليسون، وويلي ريد، ومارك جاكوود لزيادة الخبرة في علم الجراثيم، والتشخيص البيطري، وعلم الأحياء الجزيئي على التوالي. وقد عين ديفيد سواين رئيس لجنة التحرير خلفاً لجراهام بورشيز رئيس لجنة تحرير الطبعة الثالثة. وأعيد تعيين جيمس بيرسون ضمن لجنة الطبعة الرابعة للاستمرار في زيادة الخبرة في علم الفيروسات. وقد تم إجراء عدة تغييرات هامة في الطبعة الرابعة بإضافة خمسة فصولٍ جديدة، وهي: مبادئ التشخيص المخبري، والإصابة بالبكتريا الأنف قصبية الطيرية، وفيروس بارفو الأوز (مرض ديرزي)، وطرق التعرف الجزيئية، وأنظمة كشف مولد الضد (الأنتيجين). وقد أُعيد تنظيم وتجميع ستة فصولٍ بسبب المواضيع المشتركة أو المسببات ذات العلاقة؛ فقد تم دمج ريتكلواندوثيليوسيس (شباك بطاني) مع ليكوسيس/ساركوما (تكثر نسيج البيض) في فصل واحد وهو الفيروسات السرطانية، كما تم دمج التهاب المخ في الرومي مع الإصابة بفيروس أربو في فصل واحد هو الإصابة بفيروس أربو، كما تم دمج رصد

أمراض أنزيمات الجهاز المناعي في الدواجن مع الطرق المصلية في فصل واحد هو الطرق المصلية. وحذفت المقدمة ولوغاريتمات وطريقة قياس التشتت لماك فارلاند من الطبعة الثالثة. وامتدت التحسينات إلى فصولٍ فرديةٍ منها إضافة ملخص في بداية كل فصل، وتوضيح وإعادة توزيع معلومات ذُكرت في قسم تعريف الأمصال في الطبعة الثالثة إلى قسمين في الطبعة الرابعة، هما: تعريف المسبب (تقسيم العزلات)، والكشف المصلي في العائل (الكشف والعدوى في العائل). وبعض التحسينات الأخرى في الطبعة الرابعة اشتملت على ثلاثة إضافات إلى قسم الملاحق: جدول التشخيص المرجعي السريع، وقائمة بالمصطلحات والاختصارات التي استعملت في النص، وقائمة بكواشف الأمصال المضادة، وكواشف أخرى كما تم تزويدها من قبل لجنة أي أي أي بي. ويتضمن ملحق المصادر الآن، على حسب توفرها، فاكس وأرقام هاتف، وبريد إلكتروني وعناوين إنترنت الشركات المُزوِّدة لأجهزة وكواشف متخصصة. علاوة على ذلك ، تتضمن قائمة المؤلف أرقام الفاكس وعناوين البريد الإلكتروني لأعضاء لجنة التحرير والمؤلفين القدامى. هذا، وتتقدم لجنة التحرير بالشكر لكل المساهمين وعددهم ٦١ مساهماً قاموا بتجهيز الفصول الجديدة ومراجعة الفصول الموجودة في الطبعة الرابعة. ونشكر كل من كارين هيليكسون، وكاثي إيرلي، وأعضاء آخرين في دار نشر ألين، لورانس، بولاية كنساس، على خدمات تحرير الطبعة الرابعة. ونشكر أيضاً ديبرا دوك ورث بمختبر الدواجن الجنوبي الشرقي للدعم الكتابي. ونشكر بامتنان سو كلانتون بجامعة جورجيا لصياغة وتصحيح التحرير وتجميع هذا الكتاب.

لجنة التحرير

ديفيد إ. سواين (الرئيس)

جون ر. جليسون

مارك و. جاكوود

جيمس إ. ب سون

ويلي م. ريد

المشاركون في التأليف
CONTRIBUTING AUTHORS

Dennis J. Alexander
Central Veterinary Laboratory (Weybridge)
New Haw, Addlestone
Surrey KT15 3NB
United Kingdom
E-mail: dalexander@gtnet.gov.uk
FAX: +44-1932-357856

Arthur A. Andersen
USDA, Agricultural Research Service
National Animal Disease Center
P.O. Box 70
Ames, Iowa 50010
E-mail: aanderse@nadc.ars.usda.gov
FAX: (515) 239-8458

Lawrence H. Arp
Department of Toxicology and Pathology
Hoffman-LaRoche, Inc.
340 Kingsland St., Bldg 1003
Nutley, New Jersey 07110

H. John Barnes
Department of Food Animal and Equine Medicine
College of Veterinary Medicine
North Carolina State University
4700 Hillsborough Street
Raleigh, North Carolina 27606
FAX: (919) 829-4383

Charles W. Beard
U.S. Poultry and Egg Association
1530 Cooledge Road
Tucker, Georgia 30084
E-mail: cbeard@poultryegg.org
FAX: (770) 493-9257

Arthur A. Bickford
University of California-Davis
California Veterinary Diagnostic Laboratory System
Turlock Branch
P.O. Box P
Turlock, California 95381

Pat J. Blackall
Animal Research Institute
Locked Mail Bag No. 4
Moorooka, Queensland 4105
Australia
E-mail: blackcap@dpi.qld.gov.au
FAX: +61-7-33629-429

Bruce R. Charlton
California Veterinary Diagnostic Laboratory System
Turlock Branch
School of Veterinary Medicine
University of California – Davis
P.O. Box 1522
Turlock, California 95381

Richard P. Chin
California Veterinary Diagnostic Laboratory System
Fresno Branch
School of Veterinary Medicine
University of California – Davis
2789 S. Orange Ave.
Fresno, California 93725
E-mail: rchin@cvdls.ucdavis.edu
FAX: (209) 485-8097

Sandra S. Cloud
Dept. of Animal and Food Sciences
University of Delaware
Newark, Delaware 19717-1303
E-mail: scloud@udel.edu
FAX: (302) 831-8177

George L. Cooper
School of Veterinary Medicine
University of California-Davis
Calif. Vet. Diagnostic Lab. System
Turlock Branch
P.O. Box P
Turlock, California 95381
E-mail: gcooper@cvdls.ucdavis.edu
FAX: (209) 667-4261

Charles H. Domermuth
Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine
Virginia Polytechnic Institute and State University
Blacksburg, Virginia 24061

Aly M. Fadly
USDA - Agricultural Research Service
Avian Disease and Oncology Laboratory
3606 East Mount Hope Road
East Lansing, Michigan 48823
E-mail: fadly@pilot.msu.edu
FAX: (517) 337-6776

Richard K. Gast
USDA - Agricultural Research Service
Southeast Poultry Research Service
934 College Station Road
Athens, Georgia 30605
E-mail: rgast@asrr.arsusda.gov
FAX: (706) 546-3161

Jack Gelb, Jr.
Department of Animal and Food Sciences
College of Agricultural Sciences
University of Delaware
Newark, Delaware 19717-1303
E-mail: jgelb@udel.edu
FAX: (302) 831-8177

John R. Glisson
Department of Avian Medicine
College of Veterinary Medicine
The University of Georgia
Athens, Georgia 30602-4875
E-mail: jglisson@arches.uga.edu
FAX: (706) 542-5630

Richard E. Gough
Central Veterinary Laboratory (Weybridge)
New Haw, Addlestone
Surrey KT15 3NB
United Kingdom
FAX: +44-1932-357856

W. Burnham Gross
Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine
Virginia Polytechnic Institute and State University
Blacksburg, Virginia 24061

Kathleen S. Harrington
Department of Epidemiology and Community Health
School of Veterinary Medicine
Louisiana State University
Baton Rouge, Louisiana 70803-8404

Fredric J. Hoerr
Alabama Department of Agriculture and Industries
C. S. Roberts Veterinary Diagnostic Laboratory
P. O. Box 2209
Auburn, Alabama 36831-2209
E-mail: fhoerr@mindspring.com
FAX: (334) 826-3592

Daral J. Jackwood
Food Animal Health Research Program
Ohio Agricultural Research and Development Center
The Ohio State University
1680 Madison Ave
Wooster, Ohio 44691
E-mail: jackwood.2@osu.edu
FAX: (350) 263-3677

Mark W. Jackwood
Department of Avian Medicine
College of Veterinary Medicine
The University of Georgia
Athens, Georgia 30602-4875
E-mail: mjackwoo@arches.uga.edu
FAX: (706) 542-5630

Marcus M. Jensen
Department of Microbiology
Brigham Young University
Provo, Utah 84602

Erhard F. Kaleta
Institute for Avian and Reptile Medicine
Justus-Liebig-University
Frankfurter Straβe 91, D-35392 Gieβen
Germany
E-mail: erhard.f.kaleta@vetmed.uni-giessen.de
FAX: +49-641-201548

Stanley H. Kleven
Department of Avian Medicine
College of Veterinary Medicine
University of Georgia
Athens, Georgia 30602-4875
E-mail: skleven@arches.uga.edu
FAX: (706) 542-5630

Robert A. Kunkle
Avian and Swine Respiratory Diseases Research Unit
USDA, ARS, MWA, National Animal Disease Center
2300 Dayton Road
Ames, Iowa 50010
E-mail: rkunkle@nadc.ars.usda.gov
FAX: (515) 239-8458

Margie D. Lee
Department of Medical Microbiology
College of Veterinary Medicine
The University of Georgia
Athens, Georgia 30602
E-mail: leem@calc.vet.uga.edu
FAX: (706) 542-5771

Phil D. Lukert
Department of Medical Microbiology
College of Veterinary Medicine
University of Georgia
Athens, Georgia 30602
E-mail: plukert@clac.vet.uga.edu
FAX: (706) 542-5771

J. Brian McFerran
19 Knocktern Gardens
Belfast BT4 3LZ
Northern Ireland
FAX: +44-1232-658040

M. Stewart McNulty
Department of Agriculture
Veterinary Sciences Division
Stormont, Belfast BT4 3SD
Northern Ireland
FAX: +44-1232-525773

Edward T. Mallinson
Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine
University of Maryland
8075 Greenmead Drive
College Park, Maryland 20742-3711
FAX: (301) 935-6079

David A. Miller
National Veterinary Services Laboratories
USDA-APHIS-VS
1800 Dayton Road
Ames, Iowa 50010
E-mail: damiller@aphis.usda.gov
FAX: (515) 239-8569

Norman O. Olson (Retired)
1301 Heritage Place
Morgantown, West Virginia 26505

James E. Pearson
National Veterinary Services Laboratories
Veterinary Services
Animal and Plant Health Inspection Service
United States Department of Agriculture
Ames, Iowa 50010
E-mail: jpearson@aphis.usda.gov
FAX: (515) 239-8397

F. William Pierson
Center for Molecular Medicine and Infectious Diseases
Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine
Virginia Polytechnic Institute and State University
Blacksburg, Virginia 24061
E-mail: pierson@vt.edu
FAX: (540) 231-3426

H. Graham Purchase
Bureau of Animal Health & Diagnostic Services
State Veterinary Laboratory
2305 N. Cameron Street
Harrisburg, Pennsylvania 17110-9449
FAX: (717) 772-3895
E-mail: purchase@adh.pda.state.pa.us

Willie M. Reed
Animal Health Diagnostic Laboratory
College of Veterinary Medicine
B645 West Fee Hall
Michigan State University
East Lansing, Michigan 48824-1315
E-mail: reed@ahdlms.cvm.msu.edu
FAX: (517) 353-5096

Donald L. Reynolds
Veterinary Medical Research Institute
College of Veterinary Medicine
Iowa State University
Ames, Iowa 50011
E-mail: dlr@iastate.edu
FAX: (515) 294-1401

John L. Richard
Romer Labs
1301 Stylemaster Drive
Union, Missouri 63084
E-mail: jrichard@romerlabs.com
FAX: (314) 583-6553

Richard B. Rimler
USDA, Agricultural Research Services
National Animal Disease Center
P.O. Box 70
Ames, Iowa 50010
E-mail: rrimler@nadc.ars.usda.gov
FAX: (515) 239-8458

Branson W. Ritchie
Department of Medical Microbiology
College of Veterinary Medicine
University of Georgia
Athens, Georgia 30602
FAX: (706) 542-6460

John. K. Rosenberger
Department of Animal and Food Sciences
College of Agricultural Sciences
University of Delaware
Newark, Delaware 19717-1303
E-mail: john.rosenberger@mvs.udel.edu
FAX: (302) 831-8177

Y. M. Saif
Food Animal Health Research Program
Ohio Agricultural Research and Development Center
The Ohio State University
1680 Madison Avenue
Wooster, Ohio 44691
E-mail: saif.1@osu.edu
FAX: (330) 263-3677

Tirath S. Sandhu
Cornell University Duck Research Laboratory
P.O. Box 217, 192 Old Country Road
Eastport, Long Island, New York 11941

Karel A. Schat
Department of Microbiology & Immunology
College of Veterinary Medicine
Cornell University
Ithaca, New York 14853
E-mail: kas24@cornell.edu
FAX: (607) 253-3384

Dennis A. Senne
National Veterinary Services Laboratories
Veterinary Services
Animal and Plant Health Inspection Service
United States Department of Agriculture
Ames, Iowa 50010
E-mail: dsenne@aphis.usda.gov
FAX: (515) 239-8348

Simon M. Shane
Department of Epidemiology and Community Health
School of Veterinary Medicine
Louisiana State University
Baton Rouge, Louisiana 70803-8404
E-mail: smshane@vt8200.vetmed.lsu.edu
FAX: (504) 346-3295

Jagdev M. Sharma
Department of Veterinary PathoBiology
College of Veterinary Medicine
University of Minnesota
St. Paul, Minnesota 55108
E-mail: sharm001@maroon.tc.umn.edu
FAX: (612) 625-5203

J. Kirk Skeeles
Center of Excellence for Poultry Science
1260 W. Maple, Rm O-114
University of Arkansas
Fayetteville, Arkansas 72701
E-mail: skeeles@comp.uark.edu
FAX: (501) 575-4202

David E. Swayne
USDA-Agricultural Research Service
Southeast Poultry Research Laboratory
934 College Station Road
Athens, Georgia 30605
E-mail: dswayne@uga.cc.uga.edu
FAX: (706) 546-3161

Stephan G. Thayer
Department of Avian Medicine
College of Veterinary Medicine
The University of Georgia
Athens, Georgia 30602-4875
E-mail: sthayer@arches.uga.edu
FAX: (706) 542-5630

Charles O. Theon
Department of Microbiology, Immunology and Preventive Medicine
College of Veterinary Medicine
Iowa State University
2180 Veterinary Medicine Complex
Ames, Iowa 50011
E-mail: ctheon@iastate.edu
FAX: (515) 294-8500

Deoki N. Tripathy
Department of Veterinary Pathobiology
College of Veterinary Medicine
University of Illinois
Urbana, Illinois 61801
E-mail: tripathy@uxl.cso.uiuc.edu
FAX: (217) 244-7421

Pedro Villegas
Department of Avian Medicine
College of Veterinary Medicine
University of Georgia
Athens, Georgia 30602-4875
E-mail: pedrov@avmed.avian.uga.edu
FAX: (706) 542-5630

Louis van der Heide
Dept. of Pathobiology U-89
61 N. Eagleville Road
University of Connecticut
Storrs, Connecticut 06269-3089
FAX: (860) 486-4792

Dennis P. Wages
Department of Food Animal and Equine Medicine
College of Veterinary Medicine
North Carolina State University
4700 Hillsborough Street
Raleigh, North Carolina 27606
E-mail: dennis.wages@ncsu.edu
FAX: (919) 829-4464

W. Douglas Waltman
Georgia Poultry Laboratory
P.O. Box 20
4457 Oakwood Road
Oakwood, Georgia 30566
FAX: (770) 535-1948

Richard L. Witter
USDA - Agricultural Research Service
Avian Disease and Oncology Laboratory
3606 East Mount Hope Road
East Lansing, Michigan 48823

Peter R. Woolcock
California Veterinary Diagnostic Laboratory System
Fresno Branch
School of Veterinary Medicine
University of California - Davis
2789 S. Orange Ave
Fresno, California 93725
E-mail: pwoolcock@cvdls.ucdavis.edu
FAX: (209) 485-8097

Peter J. Wyeth
Central Veterinary Laboratory (Weybridge)
New Haw, Allstone
Surrey KT15 3NB
United Kingdom
FAX: +44-1832-347046

Richard Yamamoto
Department of Population Health and Reproduction
School of Veterinary Medicine
University of California
Davis, California 95616

المحتويات

الجزء الثاني



الفصل الحادي والثلاثون

التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري (الفيروس الرئوي)

AVIAN RHINOTRACHEITIS (ART) (PNEMOVIRUS)

ريتشارد إ. غوف، ودينيس ج. ألكسندر، وبيتر ج. وايث

Richard E. Gough, Dennis J. Alexander, and Peter J. Wyeth

ا لمخص Summary

التهاب الأنف قصبي الطيري (ART) هو إصابة الجهاز التنفسي العلوي في الرومي والدجاج ويسببه فيروس ينتمي لجنس الفيروس الرئوي *Pneumovirus*. يسبب المرض خسائر اقتصادية معنوية في قطعان الرومي، وخاصة عند حدوث إصابات بميكروبات ثانوية. تتفاوت نسبة النفوق لكنها قد تزيد عن ٨٠٪ في الرومي الصغير القابل للإصابة. يمكن أن تحدث الإصابة في قطعان التربية مسببة مشاكل خطيرة في إنتاج البيض.

تعريف ا سبب Agent Identification

يمكن أن يكون العزل الفيروسي صعباً إذا لم تؤخذ العينات في المرحلة المبكرة من المرض. الزراعة من القصبة الهوائية هي أكثر الطرق حساسية في العزل والزرع لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري. تستخدم تقنيات المجهر الإلكتروني وتعادل الفيروس كثيراً للتعرف على الفيروس. أوضح استخدام الأجسام المضادة أحادية النسيلة والدراسات تعكس الجزيئية التنوع الأنتيجيني بين المعزولات تحت الدراسة.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

أفضل طرق تأكيد الإصابة يتم بواسطة الاختبارات المصلية، خصوصاً طرق الإليزا. يمارس التحصين في البلاد حيث ينتشر المرض في كلٍّ من الرومي والدجاج. لم يتم تسجيل التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري في أستراليا وأمريكا الشمالية.

مقدمة Introduction

التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري هو إصابة حادة عالية الوبائية في الرومي والدجاج وتسبب عدوى الجهاز التفسي العلوي. المسبب المسؤول عن المرض هو فيروس ينتمي لجنس الفيروس الرئوي *Pnemovirus* وعائلة باراميكسو (1). يسبب المرض في الرومي مرض يسمى التهاب الأنف والقصبة الهوائية في الرومي (TRT). يصيب الفيروس أيضاً الدجاج ويرتبط بمتلازمة تضخم الرأس (SHS) (2). تشير الأدلة المصلية أن المرض ينتشر خلال العالم ، لكنه لا يوجد في الولايات المتحدة وأستراليا. عزلت الفيروسات الرئوية من الدواجن التي بها مرض تنفسي في العديد من البلاد الأوروبية والأفريقية والشرق الأقصى.

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

أوجزت الأعراض الإكلينيكية المختلفة لمرض التهاب الأنف والقصبة الهوائية في الرومي (9). تشمل الأعراض في الرومي الصغير نتر الرأس بشدة snicking ، أصوات تنفسية خشنة وعطس وإفرازات أنفية والتهاب الملتحمة الرغوي وتضخم الجيوب الأنفية وأديما تحت الفكين. تضاعف العوامل الثانوية الطارئة الأعراض المرضية بشكل مأسوي. في الرومي البياض. تسبب الإصابة العادية أعراضاً تنفسية خفيفة لكن مع هبوط ملحوظ في إنتاج البيض لحد ٧٠٪. في بعض قطعان الرومي البالغ اكتشفت الإصابات تحت الإكلينيكية بواسطة التحول المصلي. عند رؤية المرض تكون نسبة الإصابة بالمرض كحد أعلى ١٠٠٪ ، مع نفوق يتراوح من ٠,٥٪ في الطيور البالغة حتى ٨٥٪ في الطيور الصغيرة. الأعراض السريرية للإصابة في الدجاج أقل تميزاً عن المرض في الرومي. في القطعان البياضة ، خصوصاً أمهات اللاحم يسبق الأعراض التنفسية غالباً الانخفاض الملحوظ في إنتاج البيض. قد تحدث أعراضاً تنفسية شديدة في بدارى الدجاج خاصة عند المضاعفة بالممرضات الثانوية مثل فيروس الالتهاب الشعبي والميكوبلازما والإشريكية القولونية. ترتبط الأعراض المرضية مع تضخم الجيوب الأنفية تحت وفوق الحجاجية (التي تسمى متلازمة تضخم الرأس) ، والتواء الرقبة ، وعدم اتزان الحركة ، والخمول. تم وصف الدلائل التشريحية المرضية والإكلينيكية للفيروس الرئوي المرتبط مع متلازمة تضخم الرأس تفصيلاً في موضع آخر (10).

ع العينات Sample Collection

إظهار الأجسام المضادة النوعية في عينات المصل من الحالات الحادة والشفاء هو الطريقة المعتادة للتشخيص. عزل فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري من القصبة الهوائية والرئتين والأحشاء من الطيور المصابة ، لكن أغلب العينات نجاحاً لحد بعيد تكون من إفراز الأنف وكحتات نسيج الجيوب الأنفية. أخذ العينات من الطيور

الظاهرة لأعراض مبكرة من الإصابة مهماً جداً، لأن محاولات العزل تمت بنجاح كبير من الطيور التي بها أعراض شديدة خصوصاً من الدجاج الذي به تضخم رأس واضح.

لعزل الفيروس، يعمل معلق ٢٠٪ (حجم/حجم) من الإفراز الأنفي والأنسجة المطحونة في منظم ملح فوسفات يحتوي على مضادات حيوية وعند درجة رقم حموضة ٧,٠ — ٧,٤. ينقى بالطرد المركزي عند ١٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق ويمرر خلال مرشح غشائي ٤٥ نانوميكروناً.

ا واد وبيئة الزرع ا فضلة Preferred Culture Media and Substrate

أفضل الطرق للعزل الفيروسي الأولي من الطيور المصابة يكون في مزارع عضو القصبة الهوائية أو بيض الدجاج والرومي المخصب والزرع التالي في مزارع الخلية.

مزرعة عضو القصبة ا وائية Tracheal Organ Culture

تحضر مزرعة عضو القصبة من أجنة الرومي أو الرومي الصغير جداً المأخوذ من قطعان خالية من الأجسام المضادة النوعية لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري. يمكن أيضاً أن تستخدم القصبات من أجنة الدجاج أو صيصان دجاج عمر يوم أو يومين. تغسل قطاعات عرضية من القصبة في محلول فسيولوجي رقم حموضة ٧,٢، وتوضع في أنبوب يحتوي على وسط إيجل السائل مع مضادات حيوية ويترك عند ٣٧ْ م. للحقن بالمادة الممرضة، يصرف السائل من الأنبوبة ويضاف ٠,١ مل من الطعم. بعد التحضين لمدة ساعة عند ٣٧ْ م تضاف بيئة النمو وتحضن المزرعة عند ٣٧ْ م على هزاز يهتز بمعدل ٣٠ دورة في الساعة. تفحص المزارع يومياً بعد الهز على مازج معملي لإزالة الشوائب من التجويف. قد يحدث سكون في الأهداب خلال سبعة أيام من الحقن عند التمرير الأولي لكن عادة يحدث سريعاً وبثبات فقط بعد عدة تمريرات عمياء.

الزرع بيض الأجنة Culture in Embryonating Eggs

يحقن بيض أجنة الدجاج والرومي عند عمر ٦ — ٧ أيام مأخوذ من قطعان معلوم خلوها من الأجسام المضادة لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري عن طريق كيس المح بكمية ٠,١ — ٠,٢ مل من المادة الخالية من البكتيريا والمأخوذة من طيور مصابة ويحضن البيض عند ٣٧ْ م. في خلال ٧ — ١٠ أيام، يكون هناك عادة مؤشر لتقزم الأجنة وبعض النفوق. من العادي رؤية نفوق الأجنة بثبات بعد ٤ — ٥ تمريرات فقط.

مزرعة ا لية Cell Culture

ثبت أن مزرعة الخلية ناجحة للعزل الأولي للفيروس، إلا أنه بمجرد تأقلم الفيروس لأي من الأنظمة الموصوفة سابقاً، ينمو فيها فقط لمستويات قليلة، يكون الفيروس معداً للتكاثر لمستويات عالية في خلايا أجنة الدجاج أو الرومي الابتدائية وخلايا فيرو Vero وخلايا BSC-1. يحدث الفيروس تأثيراً مرضياً خلوياً متميزاً مع تكوين مدمج خلوي في خلال سبعة أيام.

تعريف ا سبب Agent Identification

الشكل ا ورفولوجي Morphology

الفيروس له شكل فيروسات باراميكسو بواسطة التباين السالب بالمجهر الإلكتروني. عادة تشاهد جزيئات مهدبة متعددة الشكل وخشنة كروية ونصف قطرها من ٨٠ – ٢٠٠ نانوميكرون. أحياناً يوجد أشكال خيطية أكبر التي قد تصل إلى ١٠٠٠ نانوميكرون في الطول. البروزات السطحية تكون ١٣- ١٤ نانوميكروناً في الطول والنيكليوكابسيد اللولبي الذي يمكن أن يرى أحياناً منبعثاً من جزيئات قطرها ١٤ نانوميكرون بمنحدر تقديري سبعة نانوميكرونات لكل دور (4).

ا واص الفيزيوكيميائية Physicochemical Properties

الفيروسات الرئوية للطيور هي أعضاء من جنس الفيروس الرئوي تنتمي إلى عائلة باراميكسو وهي فيروسات بها الحامض النووي الريبوزي مع التماثل اللولبي. المجين غير مقسم ومفرد الشريط وسالب القطبية. في تدريج السكروز تكون كثافة الطفو لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري من الرومي ١,٢١ جم/مل مع وزن جزيئي تقريبي ٥٠٠ x ١٠^{٦} (4). بالاشتراك مع الأعضاء الآخرين لعائلة باراميكسو، تتأثر حيوية أو إمراضية فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري سريعاً بمذيبات الدهون والحرارة (٥٦°م لمدة ٣٠ دقيقة) والأس الهيدروجيني الشديد القاعدية.

ا واص البيولوجية Biological Properties

بخلاف الأعضاء الأخرى لعائلة باراميكسو، لا يمتلك فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري نشاط تلازن الدم وإنزيم نيورامينيداز.

التعرف الجزيئي Molecular Identification

باستخدام تحليل الفصل الكهربائي في هلام عديد الأكريلاميد بواسطة دوديسيل سلفات الصوديوم (SDS-PAGE) يتضح أن فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري يمتلك ثلاث حلقات بيبتيدية تركيبية عديدة structural polypeptides مميزة للفيروسات الرئوية وتفرقها من فيروسات موربيلي وباراميكسو (11)، إلا أنه باستخدام تقنيات الترسيب المناعي التصالبي لم تظهر علاقات أنتيجينية بين معزولات الرومي والفيروسات الرئوية في الثدييات (2). استخدم اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل لكشف فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري في مسحات من الرومي المصاب (7). استخدم هذا الاختبار أيضاً لتأكيد تشابه فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري المعزول من الدجاج (12).

الكشف الأنتيجيني Antigen Detection

سجلت طريقة الكشف عن أنتيجينات فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري في الرومي في الأنسجة المثبتة بالفورمالين باستعمال طريقة الإنزيم المناعي المقترن بالإستربت-أفيدين-بيوتين streptavidin-biotin-immunoperoxidase (12).

التقنيات المناعية Immunological Techniques

يمكن استخدام اختبارات التعادل باستعمال المضاد المصلي الأحادي النوعي لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري لتأكيد تشابه الفيروسات المعزولة في مزارع الخلية أو العضو. نظراً لقلة تركيز الفيروس الطريقة التي تستخدم أكثر شيوعاً هي اختبار ألفا (مصل ثابت – فيروس مخفف). يحضن مخلوط المصل والفيروس عند ٣٧°م لمدة ٤٥ دقيقة ويقاس بعد ذلك في مزارع الخلية أو العضو للفيروس الحي. انخفاض مستوى الإمراضية حتى $١٠^{٢}$ أو أكثر يعتبر معنوياً.

استخدم أيضاً اختبار الانتشار المناعي لتأكيد التشابه في معزولات التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري (6). باختصار تزرع المعزولات في مزارع الخلايا لتعطي مستوى إمراضية تقريباً $١٠^{٦}$ $TCID_{50}$ لكل ملليتر. بعد حدوث تأثير مرضي خلوي شديد، يزال راسب الخلايا وتركز السوائل الرائقة بالطرد المركزي الفائق السرعة. يعامل المركز الناتج بمحلول ٠,٢٪ لوريل ساركوسين N-lauroylsarcosine لإنتاج أنتيجينات لاختبار الانتشار المناعي. يختبر الأنتيجين باستعمال مضاد مصل أحادي النسيلة لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري بواسطة الانتشار المناعي المزدوج في ١٪ آجاروز. بعد ٢٤ ساعة تقريباً عند ٣٧°م. تفحص الاختبارات وأي خطوط ترسيب تصبغ بصبغة كوماسي الزرقاء ٠,٢٪ Coomassie brilliant blue تفسر كايجابية. يشمل الاختبار الضوابط الإيجابية والسالبة

المناسبة للأنتيجينات والأمصال. خط الترسيب بين المضاد المصلي النوع الأحادي المرجعي والأنتيجين المختبر يؤكد تعريف الفيروس.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

نظراً للصعوبة في العزل والتعرف على فيروسات التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري، تأكيد العدوى يكون عادة بواسطة طرق المصلية. أكثر الطرق التي توظف هي الإليزا. تشمل الطرق الأخرى تعادل الفيروس والتألق المناعي واختبارات الانتشار المناعي.

كلٌّ من عينات المصل من الحالات الحرجة والناقهة يجب الحصول عليها للاختبار ويجب أن تسخن عند ٥٦°م لمدة ٣٠ دقيقة وتخزن عند -٢٠°م عند حتمية التأخر في الاختبار.

اختبار الإليزا Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

تطورت عدة أطقم تجارية جنباً إلى جنب مع طرق تقييم سريعة للكشف عن الأجسام المضادة لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري (11). على الرغم أن الإليزا مفيدة جداً في فحص عدد كبير من الأمصال، سجلت الفروق في الحساسية والنوعية بين الاختبارات (14) وهذا يكون أساساً نتيجة للتباين في الأنتيجينية والنقاء للأنتيجينات الفيروسية المستخدمة في تجهيز أطقم الإليزا. تطورت حديثاً الإليزا التنافسية أو التوقيفية competitive or blocking ELISA بالاتحاد مع الأجسام المضادة أحادية النسيلة المحضرة لطيف واسع الحساسية للكشف عن الأجسام المضادة للعديد من عترات فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري.

إنتاج الأنتيج Antigen Production

يعدى مندمج الطبقة الأحادية لمزرعة خلايا الدجاج الليفية (CEF) بفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري عند تعددية تقريبية من ٠,٠١ إلى ٠,١ $TCID_{50}$ لكل خلية وتحضن عند ٣٧°م حتى ملاحظة التأثير المرضي الخلوي، وعند هذا الوقت تخضع لدورة تجميد وإذابة يعقبها المعاملة بمحلول Nonidet P40 ٠,٥٪ (حجم/حجم) المنتجة من شركة (BDH Chemicals, Ltd., Lutterworth, Leicestershire, United Kingdom) في محلول ملح فوسفات رقم حموضة ٧,٢ لمدة ساعة عند ٤°م. ينقى المعلق الناتج بعد ذلك بالطرد المركزي عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق. تبطن أطباق الإليزا بكمية ١٠٠ ميكروليتر من الأنتيجين المخفف ١ : ١٠٠٠ في محلول ملح التبطين (٥٠ مللي مول من محلول كاربونات/بيكربونات رقم حموضة ٩,٦) وتترك طوال الليل عند ٤°م. بعد إزالة السائل الإضافي،

تغسل الحفر ٥ مرات في محلول الغسيل (PBS 7.2 + 0.05% Tween 80). تزال السوائل الإضافية وتجفف عند ٣٧ °م. يمكن تخزين أطباق مبطنة بمزارع خلايا غير مصابة لتستخدم كضابط سالب.

طريقة الاختبار Test Procedure

تخفف الأمصال المختبرة معاً والأمصال الضابط الإيجابية السالبة ١ : ١٠٠ في محلول التخفيف (PBS 7.2 + 0.05% Tween 80 + 5% fetal calf serum) وتضاعف ١٠٠ ميكروليتر من العينات يضاف لكل حفرة. تحضن الأطباق لمدة ساعة عند ٣٧ °م وتغسل خمس مرات كما وصف سابقاً. بعد إزالة السوائل الزائدة، يضاف ١٠٠ ميكروليتر من تخفيف ١ : ١٠٠٠ من goat anti-turkey IgG peroxidase-labeled conjugate لكل حفرة وتحضن لمدة ساعة عند ٣٧ °م. يمكن استخدام (Goat anti-chicken IgG conjugate) لاختبار أمصال الدجاج. تغسل الأطباق خمس مرات وتزال أي سوائل زائدة. يضاف ١٠٠ ميكروليتر من مادة TMB لكل حفرة وبعد ١٥ دقيقة عند حرارة الغرفة يوقف التفاعل بمحلول الإيقاف ١٠٠ ميكروليتر (٢,٥ مللي مول حمض كبريتيك). تقرأ الأطباق بجهاز قياس الطيف عند ٤٥٠ نانوميتر خلال ١٥ دقيقة من إضافة محلول التوقيف. قيمة الامتصاص لكل مصل يعبر كنسبة قيمة العينة بالنسبة إلى قيمة الضابط الإيجابي S/P ratio كالتالي :

$$\text{نسبة العينة/الإيجابي} = \frac{\text{امتصاص العينة} - \text{امتصاص الضابط السالب}}{\text{امتصاص الضابط الموجب} - \text{امتصاص الضابط السالب}}$$

الأمصال التي لها نسبة S/P (>0.25) تعتبر إيجابية.

اختبار التألق ا ناعي Fluorescent Antibody Test

وصفت عدة طرق لكشف الأجسام المضادة لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري باستخدام اختبارات التألق المناعي غير المباشرة على الأنسجة المصابة أو مزارع الخلايا (11). أظهرت الدراسات أن الأجسام المضادة للفيروس يمكن أن تكتشف بواسطة هذا الاختبار حوالي خمسة أيام بعد ظهور الأعراض المرضية.

اختبار تعادل الف وس Virus Neutralization Test

يمكن اكتشاف الأجسام المضادة للفيروس بتقنيات التعادل القياسية في مزارع عضو القصبة ومزارع الخلية الحساسة المختلفة مثل خلايا أجنة الدجاج الليفية وكبد أجنة الدجاج وخلايا فيرو (11). اتضح باستعمال قياس

التعادل في خلايا أجنة الدجاج الليفية الأجسام المضادة التعادلية يمكن اكتشافها خلال خمسة أيام بعد ظهور الأعراض المرضية وتبدأ في الانحدار عند اليوم ١٣. أظهرت النتائج ارتباطاً جيداً مع الإليزا والتألق المناعي (3). يمكن أن يجرى اختبار تعادل الفيروس في مندمج الطبقة الواحدة لخلايا أجنة الدجاج في طبق المعايرة الدقيقة مسطح القاع ذو ٩٦ حفرة. باختصار، يتفاعل الفيروس (٣٠ — ٣٠٠ $TCID_{50}$) مع تخفيفات مزدوجة ثنائية من المصل تحت الاختبار عند ٣٧°م في ٥٪ ثاني أكسيد الكربون. بعد ساعة ينقل ٢٥ ميكروليتراً من كل تخفيف في طبق التعادل للحفرة المقابلة في طبق مزرعة الخلية. تغلق الأطباق وتحضن عند ٣٧°م في ٥٪ ثاني أكسيد الكربون مع ضوابط المصل والفيروس المناسبة. بعد ساعة يضاف ٢٠٠ ميكروليتراً من بيئة النمو لكل حفرة وتغلق الأطباق وتحضن عند ٣٧°م في ٥٪ ثاني أكسيد الكربون لمدة ٧ أيام. تفحص المزارع يومياً للتأثير المرضي الخلوي لمدة أسبوع ويحدد معيار المصل ويعبر عنه بمقلوب (لوغاريتم ٢) أعلى تخفيف من المصل يوقف التأثير المرضي الخلوي الفيروسي. يعتبر المعيار ($> 2^3$) إيجابياً.

التفريق من العوامل ا مرضة قريبة الشبه Differentiation from Closely Related Agents

تباين العترة Strain Variability

باستخدام الاختبارات المصلية التقليدية، سجلت العلاقة الأنتجينية بين المعزولات لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري من المملكة المتحدة وفرنسا (11). أوضحت حديثاً استخدام الأجسام المضادة أحادية النسيلة الاختلاف الأنتيجيني بين المعزولات الأوربية للفيروس (5). أظهر التتابع النيوكليوتيدي لجينات البروتينات النشوية الملتصقة من خمسة فيروسات أوروبية أنه يوجد على الأقل عدد ٢ تحت مجموعة والتي يمكن تفريقهما على أساس الهضم بالقصر الإنزيمي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل ممثلاً للجين الكامل (8).

مرض نيوكاسيل Newcastle Disease

يمكن أن تسبب بعض عترات فيروس مرض نيوكاسيل وبعض أعضاء جنس فيروسات باراميكسو مثل PMV-3 (انظر الفصل الثلاثون على مرض نيوكاسيل وفيروسات باراميكسو الأخرى) مرضاً تنفسياً ومشاكل في إنتاج البيض في الدجاج والرومي قريبة الشبه بفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري. تتشابه فيروسات باراميكسو في الشكل لكنها عادة سهلة التفريق من فيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري بسبب امتلاكها خاصية تلازن الدم ونشاط إنزيم نيورامينيداز.

الالتهاب الشع ا عدي Infectious Bronchitis

الإصابة بهذا الفيروس يمكن أن يسبب مرضاً تنفسياً ومشاكل في إنتاج البيض مشابهة لمرض التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري. التعريف المصلي للفيروس الممرض هو أسهل الطرق لعمل التشخيص التفريقي.

إنفلونزا الطيور Avian Influenza

يمكن أن تتسبب إصابة الدجاج والرومي بالعترات الخفيفة لإنفلونزا الطيور في مرض مشابه لمرض التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري. العزل الفيروسي وإظهار خاصية تلازن الدم بواسطة فيروس الإنفلونزا تفرق بين هذه الفيروسات.

البكت يا وا يكوبلازما Bacteria and Mycoplasma

يوجد مدى واسع من البكتيريا والميكوبلازما تسبب أعراضاً مرضية مشابهة لمرض الالتهاب الأنف القصبي الطيري. قد توجد مثل هذه الميكروبات كإصابات ثانوية أو طارئة في حالة التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري ومن ثم تسبب مشاكل تشخيصية. يعتمد التشخيص على العزل السلبي أو إظهار الأجسام المضادة لفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري.

ا راجع References

1. Alexander, D. J. Pneumovirus infections (turkey rhinotracheitis and swollen head syndrome of chickens). In: Diseases of poultry, 9th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, and H. W. Yoder, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 669-673. 1991.
2. Alexander, D. J. Pneumoviruses (turkey rhinotracheitis and swollen head syndrome of chickens). In: Virus infections of birds. J. B. McFerran and M. S. McNulty, eds. Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 375-382. 1993.
3. Baxter-Jones, C., M. Grant, R. C. Jones and G. P. Wilding. A comparison of three methods for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus. Avian Pathol. 18:91-98. 1989.
4. Collins, M. S. and R. E. Gough. Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. J. Gen. Virol. 69:909-912. 1988.
5. Collins, M. S., R. E. Gough, and D. J. Alexander. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. Avian Pathol. 22:469-479. 1993.
6. Gough, R. E. and M. S. Collins. Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. Avian Pathol. 18:227-238. 1989.
7. Jing, L., J. K. A. Cook, T. D. K. Brown, K. Shaw, and D. Cavanagh. Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. Avian Pathol. 22:771-783. 1993.
8. Juhasz, K., and A. J. Easton. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. J. Gen. Virol. 75:2873-2880. 1994.
9. Lister, S. A. and D. J. Alexander. Turkey rhinotracheitis: A review. Vet. Bull. 56:637-663. 1986.
10. Lu, Y. S., Y. S. Shien, H. J. Tsai, C. S. Tseng, S. H. Lee, and D. F. Lin. Swollen head syndrome in Taiwan - isolation of an avian pneumovims and serological survey. Avian Pathol. 23:169-174. 1994.
11. Naylor, C. J., and R. C. Jones. Turkey rhinotracheitis: a review. Vet. Bull. 63:439-449. 1993.

12. O'Loan, C. J., and G. M. Allan. The detection of turkey rhinotracheitis virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin-biotin-immunoperoxidase method. Avian Pathol. 19:401-407. 1990.
13. Tanaka, M., H. Takuma, N. Kokumai, E. Oishi, T. Obi, K. Hiramatsu, and Y. Shimuzu. Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chickens with swollen head syndrome in Japan. J. Vet. Med. Sci. 57:939-941. 1995.
14. Toquin, D., N. Eterradossi, and M. Guittet. Use of a related ELISA antigen for efficient TRT serological testing following live vaccination. Vet. Rec. 139:71-72. 1996.

الفصل الثاني والثلاثون

الالتهاب الشعبي المعدي

INFECTIOUS BRONCHITIS

جاك جيلب الابن، ومارك و. جاكوود

Jack Gelb, Jr. and Mark W. Jackwood

الملخص Summary

يتسبب الالتهاب الشعبي المعدي بفيروس الالتهاب الشعبي وهو أحد أعضاء عائلة الفيروسات التاجية *Coronaviridae*. هذا الفيروس عالي الخصوصية للعائل يسبب عدوى طبيعية في الدجاج فقط. تُحدث العدوى الأولية في الدجاج الصغير مؤدية إلى مرض تنفسي تقليدي، لكن قد تسبب بعض العترات آفات في الكلى. يعاني الدجاج البياض والأمهات عادة من خسائر في إنتاج البيض مع أو بدون أعراض مرض تنفسي. العديد من الأنواع المصلية للفيروس مسؤولة عن الوبائيات في الدجاج بالرغم من استخدام اللقاحات الحية المضعفة والميتة، وإن هذا المرض هو مشكلة في النمو لمربي الدجاج بسبب توفر عدد محدود من الأنواع المصلية للتحصين والحماية التصالبية ضد العترات الحقلية المندمجة قد تكون ضئيلة.

تعريف العامل المسبب Agent Identification

يعتمد التشخيص الافتراضي في القطعان المشتبه بها على الأعراض الإكلينيكية الثابتة مع المرض وإظهار مؤشرات إنتاج الأجسام المناعية في المصل لفيروس الالتهاب الشعبي بواسطة الإليزا. للتشخيص التأكيدي التعريفي يجب عزل وتعريف النوع المصلي المسبب. يمكن الحصول على التعريف المصلي بواسطة تعادل الفيروس أو منع تلازن الدم أو الأجسام المضادة أحادية النسيلة أو تفاعل البلمرة المتسلسل بالنسخ العكسي. يمكن أن تستعمل اختبارات الحماية التصالبية في الدجاج لتحديد الحماية المرتقبة الناتجة بواسطة التحصين باللقاحات المختلفة لفيروس الالتهاب الشعبي أو العترات الحقلية للسيطرة على المرض.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمثل اختبارالإليزا أفضل الطرق لكشف استجابة الأجسام المضادة في المصل لكنها لا تتعرف على الأجسام المضادة النوعية للنوع المصلي. تفيد استجابة الأمصال الحادة والناقهة في تشخيص المصل ولرصد معيار تحصين القطعان.

ا قدمة Introduction

الالتهاب الشعبي المعدي هو مرض عالي الوبائية حاد إكلينيكياً للجهاز التنفسي والبولي التناسلي في الدجاج يسببه فيروس الالتهاب الشعبي المعدي وهو أحد أعضاء الفيروسات التاجية. المرض شائع في جميع أنحاء العالم حيث يُنتج الدجاج تجارياً. تعتبرالإصابات المختلطة التي تضم فيروس الالتهاب الشعبي وفيروس مرض نيوكاسيل وفيروس أدينو الطيور مجموعة ١ والميكوبلازما والإشريكية القولونية شائعة وقد تربك الجهود التشخيصية.

تم إدراك العديد من الأنواع المصلية لفيروس الالتهاب الشعبي ولها أهمية عملية في السيطرة على المرض لأن المناعة عقب الإصابة أو التحصين بنوع مصلي واحد عادة لا يحمي ضد الإصابات بالأنواع المصلية غير المرتبطة. في الولايات المتحدة، أغلب الأنواع المصلية للفيروس المعزول في الدواجن هي ماساشوسيتس Massachusetts (Mass)، وكونيكتكت Connecticut (Conn)، وأركنساس Arkansas (Ark)، وجيورجيا Georgia، وديلاور Delaware (DE/072/92)، وكاليفورنيا California. المغايرات الأنتيجينية التي لم تدرك سابقاً تم عزلها من القطعان البياضة متعددة العمر والتي بها مرض تنفسي أو مشاكل إنتاج البيض (6). أيضاً سجلت الأنواع المصلية الأنتيجينية المغايرة العديدة في الأقطار الأوروبية وأستراليا (3). بدون شك، يركز عزل العديد من العترات الكثيرة من هذه البلاد والأقطار الأخرى على زيادة وجود فيروس الالتهاب الشعبي المعدي. للتعمق في مرجعية الالتهاب الشعبي يرجع إلى King and Cavanaugh (10).

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

الدجاج عند كل الأعمار قابل للإصابة بالالتهاب الشعبي المعدي. قصر فترة الحضانة (٢٤ — ٧٢ ساعة) يمثل خاصية منفردة للمرض. تظهر الطيور الصغيرة أعراضاً مرضية تنفسية حادة وآفات في القصبة الهوائية. يمكن أن تصل نسبة الإصابة ١٠٠٪، لكن النفوق يكون عموماً أقل من ٥٪ في الوبائيات غير المضاعفة بالممرضات الثانوية أو الإصابات الراجعة. يسبب المرض في الطيور البياضة انخفاض إنتاج ونوعية البيض. لوحظ ارتشاح الخلايا الليمفاوية وتلف الخلايا الطلائية في قناة البيض (جدار قناة البيض). تحدث العترات الممرضة للكلى Nephropathogenic مثل

Holte وGray وAustralian تضخماً في الكلى مع تمدد الأنابيب والحالب واحتوائه على بلورات حمض اليوريك. قد يحدث إسهالاً وجفافاً وخمولاً ونفوق الطيور المصابة.

جمع العينات Sample Collection

يجب الحصول على العينات لعزل فيروس الالتهاب الشعبي بمجرد ظهور أعراض المرض الإكلينيكي. تفضل المسحات من القصبة الهوائية وتوضع مباشرة في بيئة باردة مع مضادات حيوية لوقف النمو البكتيري والفطري ولحفظ حيوية الفيروس. تستخدم المسحات القطنية المعقمة للطيور الكبيرة أو مسحات كالجي نوع Calgiswabs® Type 4 (Hardwood Products Company, Guilford, Maine) للصوص الصغيرة وتستعمل لمسح من ٥ — ١٠ طيور مصابة لكل قطيع. توضع المسحات في ٢ — ٣ مل من شوربة فوسفات التربتوز المعقمة الباردة بي إتش ٧ — ٧,٢ تحتوي على ١٠٠٠٠ وحدة دولية لكل ملليتر من البنسلين، و١٠٠٠٠ ميكروجرام لكل ملليتر من ستربتوميسين، و٢٥٠ وحدة دولية لكل ملليتر من أمفوتيرسين B. توضع أنابيب المسحات سريعاً على الثلج وتجمد عند —٢٠ ° م.

الأنسجة الأخرى مثل الرئة والكلى وقناة البيض واللوز الأعورية ممكن أن تجمع بطريقة معقمة. توضع في أكياس بلاستيكية محكمة الغلق أو أنابيب معقمة وتجمد عند —٢٠ ° م. ممكن أن تجمع مسحات مجمعية وتعامل كما وصف سابقاً. يجب أن تجمد كل المسحات والأنسجة وتنقل في إناء معزول إلى مختبر التشخيص الفيرولوجي.

بسبب بقاء الفيروس في الجهاز المعوي، يمكن عزل بعض العترات من اللوز الأعورية والمسحات المجمعية لعدة أسابيع بعد اختفاء الأعراض الإكلينيكية. وبناءً عليه لا يؤكد عزل الفيروس من هذه المواضع دوره كعامل مسبب في وبائيات المرض الحديثة.

تذاب بيئة شوربة فوسفات التربتوز المجمدة والمحتوية على المسحات من المجمع والقصبة وتخلط وتحضن عند درجة الغرفة (حوالي ٢٢ ° م) لمدة ٣٠ — ٦٠ دقيقة قبل الحقن لتقليل إمكانية التلوث البكتيري والفطري. يمكن تجنب التلوث بالطرد المركزي عند ١٠٠٠ إكس جي لمدة ١٥ دقيقة، وبعد ذلك تمرر السوائل الرائقة خلال مرشح الحقنة ٠,٤٥ ميكرون Acrodisc® (Gelman Sciences, Ann Arbor, Mich.) تجهز الأنسجة المطحونة (١٠٪ وزن/حجم) في شوربة فوسفات التربتوز مع مضاد حيوي بطحن الرئة والكلية وقناة البيض أو اللوز الأعورية باستعمال طاحونة أنسجة زجاجية أو هون معقم وساحق. تحضن الأنسجة المطحونة عند درجة الغرفة لمدة ٣٠ — ٦٠ دقيقة. يمكن استخدام الدجاج لمساعدة عزل فيروس الالتهاب الشعبي في القطعان (5). يوضع الدجاج الخالي من الممرضات النوعية المحصن ضد النوع أو الأنواع المصلية اللقاحية مع دجاج قابل للإصابة بفيروس الالتهاب الشعبي المعدي في أعشاش أو أقفاص في عنابر دجاج تجارية. بعد فترة تعرض أسبوع، يفصل الدجاج المعرض حقلياً ويجمع منه المسحات من القصبة

الهوائية لمحاولات عزل الفيروس. تزيد التكرارات الأسبوعية المتعاقبة المتعددة من احتمالية عزل الفيروس. يعطي استعمال الدجاج القابل للإصابة sentinels المحصن بفيروس التهاب الشعب المعدي فرصة أفضل لعزل المغايرات الأنتيجينية للفيروس الخالية من الأنواع المصلية لفيروس اللقاح الملوثة التي قد تدور في قطعان الدجاج.

ا واد وبيئات الزرع ا فضلة Preferred Culture Media and Substrates

ينمو فيروس الالتهاب الشعبي أكثر شيوعاً في أجنة البيض ومزرعة عضو القصبة الهوائية (TOC) ومزرعة خلية كلية الدجاج. يفضل بيض الأجنة لمحاولات العزل الأولي.

بيض أجنة الدجاج Embryonated Chicken Eggs

بيض أجنة الدجاج من مصدر خالي من الممرضات النوعية يوصى به في العزل الفيروسي. تحقن ١٠ أجنة عمر ٩ – ١١ يوماً بطريقة كيس الكوريوني السقائي بكمية ٠,٢ مل من السائل المعد للحقن. يفحص البيض يومياً، ويعتبر النفوق بين الأيام الثاني والسابع بعد الحقن نوعياً للفيروس. عند اليوم الثالث بعد الحقن، تؤخذ خمس بيضات من الحضانة وتوضع عند ٤°م لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة. تجمع السوائل بطريقة معقمة من البيض المحقون ويجب أن تكون خالية من البكتيريا والفطريات وتعطي تفاعلاً سلبياً لتلازن الدم مع خلايا دم الدجاج. تحضن الأجنة الباقية حتى سبعة أيام وتلاحظ بعد ذلك للآفات النمطية لفيروس الالتهاب الشعبي مثل التقزم والالتواء وعدم انشقاق الريش للخارج وترسيب أملاح اليوريا في نسيج الكلى. يلاحظ غالباً النزيف الجلدي مع العترات المميتة للجنين من فيروس الالتهاب الشعبي. تجمع الأغشية الكوريوني الأنتويس وتطحن وتختبر لفيروس الأدينو مجموعة ١ بطريقة الانتشار المناعي. إصابات الدجاج بمجموعة ١ من فيروسات الأدينو تكون شائعة ويحدث الفيروس غالباً أجنة متقزمة لا يمكن تمييزها من الأجنة المصابة بفيروس الالتهاب الشعبي المعدي. بعض المعزولات الحقلية لفيروس الالتهاب الشعبي تكون غير متأقلمة على الأجنة ولا تسبب النفوق أو تحدث آفات عند التمرير الأول. من ثم يجب عمل ثلاث تمريرات على الأقل قبل محاولة عزل الفيروس حتى تعتبر سالبة. يجب إعطاء الانتباه الخاص لترسيبات أملاح اليوريا في أنسجة الكلية في تقييم الأجنة التي تم حقنها بالمعزولات الحقلية.

مزارع العضو Organ Cultures

يمكن استخدام مزرعة عضو القصبة الهوائية من الدجاج لعزل فيروس الالتهاب الشعبي. الميزة الأولية في استخدام مزرعة عضو القصبة الهوائيةعن بيض الأجنة أن العترات الحقلية غير المتأقلمة على الأجنة من فيروس الالتهاب الشعبي تحدث تأثيرها على الأهداب في مزرعة عضو القصبة الهوائية عند أول تمرير وبسرعة بدون الحاجة

إلى تمريرات متعددة. العيب في أن استخدام مزرعة الخلية يحتاج إلى إمكانيات في التجهيز والمحافظة على مزرعة عضو القصبة الهوائية. تشمل التغيرات المحتملة الأخرى في مزرعة عضو القصبة الهوائية تفريقاً أو كشف فيروسات أخرى غير فيروس الالتهاب الشعبي في العينات الحقلية. يحدث فيروس مرض نيوكاسل والالتهاب الشعبي سكوناً شديداً في الأهداب ciliostasis عند اليوم الثالث بعد الحقن. تتكاثر فيروسات أدينو في مزرعة عضو القصبة، لكن قد لا يكتشف وجودها لأنها لا تحدث سكوناً كاملاً وسريعاً في الأهداب.

مزارع ا لية Cell Cultures

لا يوصي بالعزل الأولي لفيروس الالتهاب الشعبي في مزرعة خلية كلية الدجاج لأن الفيروس يحتاج للتأقلم في بيض الأجنة قبل تنميته في مزرعة الخلية.

تعريف ا سبب Agent Identification

ا صائص الفيزيوكيميائية Physicochemical Properties

الفيروسات التاجية هي فيروسات ذات غلاف وبها شريط مفرد من الحامض النووي الريبوزي مع التماثل اللولبي (انظر الفصل الرابع والأربعون من الكتاب) وهو فيروس متعدد الشكل وقطره يتراوح من ٨٠ – ١٢٠ نانوميكروناً. يتكون الغلاف من أشواك بروتينية كبيرة على شكل كؤوس تعطي سطح الفيروس المظهر الإكليلي المتميز. يحدث تكاثر الفيروس التاجي في السيتوبلازم. لا تمنع مثبطات دي إن إيه مثل القواعد النوكلوتيدية الهالوجينية 5-iodo-2´-deoxyuridine تكاثر فيروس الالتهاب الشعبي دالة على أن الفيروس يحتوي آر إن إيه وليس دي إن إيه. تموت معظم عترات فيروس الالتهاب الشعبي بعد ١٥ دقيقة عند ٥٦° م. يموت الفيروس بواسطة مذيبات الدهون مثل الكلوروفورم والإيثير. يمكن أن يستعمل أيضاً اختبار الحساسية لمذيبات الدهون لاستقصاء معزولات الفيروس الحقلية للفيروسات المُلوثة المجردة من الغلاف مثل فيروس أدينو مجموعة ١ وفيروس ريو.

التعرف ا صلي بواسطة تعادل الف وس ومنع تلازن الدم
Serological Identification by Virus Neutralization (VN) and Hemagglutination-Inhibition (HI)

التعادل الف وسي Virus Neutralization

إن تعادل المعزولات الحقلية لفيروس الالتهاب الشعبي بواسطة المضاد المصلي النوعي للنوع المصلي لفيروس الالتهاب الشعب يبرهن على تماثلها. يمكن أن يجرى هذا الاختبار في أجنة البيض أو مزرعة خلايا كلية الدجاج أو مزرعة عضو القصبة الهوائية. يمكن أن يؤدى الاختبار باستعمال طريقة ألفا (مصل ثابت وفيروس مخفف) أو طريقة بيتا (مصل مخفف مع فيروس ثابت). بالإضافة إلى طريقة الفيروس الثابت والمصل الثابت لتعادل

الفيروس (2) التي تكون مفيدة في تصنيف المعزولات الحقلية للفيروس. يجرى الاختبار في أجنة البيض بمفاعلة ٣٢ – ٣٢٠ متوسط جرعات ممرضة للأجنة ($EID_{50}s$) من فيروس الالتهاب الشعبي (المعزولات الحقلية) مع المضاد المصلي لعترات معروفة تحتوي على ١ – ٢٠ وحدة من الأجسام المضادة. يحدد تركيز وحدة الجسم المضاد بواسطة المعايرة ضد النوع المصلي للفيروس المشابه. أعلى تخفيف من المضاد المصلي الذي يحمي ٥٠٪ من الأجنة المحقونة يحتوي على وحدة جسم مضاد واحدة. لأن الإصابات الراجعة باثنين أو أكثر من الأنواع المصلية لفيروس الالتهاب الشعبي يكون شائعاً، فإن اختبارات التعادل الفيروسي التبادلية تكون مطلوبة أحياناً للتعرف على كل فيروسات الالتهاب الشعبي في المعزولات الحقلية. يتفاعل المضاد المصلي للمعزولة الحقلية ضد أنواع الفيروس المصلية المعروفة ليبرهن على تشابهات أو تماثل النوع المصلي المسبب.

تثبيط التلازن الدموي Hemagglutination-Inhibition

يحضر أنتيجين تلازن الدم للاختبار من السوائل الكوريونيالانتويس اللقائقي التي تم جمعها من أجنة البيض المحقونة بفيروس للالتهاب الشعبي وتركز ١٠٠ مرة بواسطة الطرد المركزي الفائق. يعامل الفيروس المركز بإنزيم نيوراميناداز (17) لمدة ساعتين عند ٣٧°م. تجرى معايرة الأنتيجين في أطباق المعايرة الدقيقة بعدد حفر ٩٦ حفرة وشكل القاع مثل حرف U باستعمال خلايا الدم الحمراء للدجاج. أُعتقد في بادئ الأمر أن معاملة الفيروس المركز بإنزيم فوسفوليبيز سي البكتيري bacterial phospholipase C تمكن الفيروس من تلازن خلايا الدم الحمراء للدجاج (1, 12)، إلا أن الأنتيجينات الناتجة باستخدام تجهيزات فوسفوليبيز عالية النقاوة غالباً لها عيارية منخفضة عن هذه المنتجة باستعمال تجهيزات فوسفوليبيز غير النقية. حددت دراسات تالية (17) أن معاملة الفيروس بتجهيزات نيوراميناداز النقية يؤدي إلى مستوى عالي من الأنتيجينات الملزنة للدم بثبات. قد يستعمل اختبار منع تلازن الدم الدقيق للتصنيف المصلي لفيروسات الالتهاب الشعبي (1, 12). يحضر أنتيجين التلازن المعامل بنيوراميناداز أولاً من المعزولات الحقلية. يضاف تركيز ٤ – ٨ وحدات تلازن دم إلى تخفيفات ثنائية (١ : ٢ إلى ١ : ١٠٢٤) من المضاد المصلي لفيروس الالتهاب الشعبي المعلوم. بعد التحضين عند درجة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة، تضاف خلايا الدم (٠,٥ - ١٪)، يقرأ الاختبار بعد ٣٠ – ٦٠ دقيقة. منع التلازن للمعزولة الحقلية بالمضاد المصلي المعلوم يتعرف على النوع المصلي لفيروس الالتهاب الشعبي.

إنتاج مضادات مصلية للتصنيف ا صلي للتعادل الف وسي ومنع التلازن

Production of Serotyping Antiserum for VN and HI

تحضر في دجاج خالي من الممرضات النوعية بحقن دجاج يتراوح عمره من ٣ – ٨ أسابيع في القصبة الهوائية بحوالي ١٠° EID50 من فيروس الالتهاب الشعبي لكل طائر. يوضع الدجاج في غرف عزل أو وحدات عزل هورسفال Horsfall. بعد أسبوعين بعد الحقن ، يعاد حقن الدجاج بالحقن الوريدي بجرعة ١٠° EID50 على الأقل من فيروس الالتهاب الشعبي. تجمع عينات الدم من الدجاج بعد أسبوعين من الحقن الوريدي بفيروس الالتهاب الشعبي. يجمع المصل ويعامل عند ٥٦ °م لمدة ٣٠ دقيقة قبل إمكانية استعماله في طرق التصنيف المشار إليها في العنوان. إنه من المهم لمضادات المصل أن تكون عالية التخصصية للأنواع المصلية المتماثلة من فيروس الالتهاب الشعبي وأن لا تتفاعل تصالبياً مع الأنواع المصلية المغايرة للفيروس. إن الحقن المتكرر (٣ مرات أو أكثر) أو استعمال المحفزات المناعية في تجهيز الأمصال المضادة للتصنيف المصلي لا ينصح به لأن الأجسام المضادة قد تتفاعل تصالبياً مع الأنواع المصلية المغايرة لفيروس الالتهاب الشعبي.

التعرف الأنتيجي لف وس الإلتهاب الشع بالأجسام ا ضادة أحادية النسيلة

Monoclonal Antibody Identification of IBV Antigen

تم إنتاج الأجسام المضادة أحادية النسيلة متخصصة النوع لتحت الوحدة S-1 من البروتينات النشوية للأنواع المصلية Mass و Conn و Ark (8) واُستخدمت للتعرف على الأنواع المصلية المحددة بواسطة إليزا الجذب الأنتيجيني (AC-ELISA (16). الأنواع الأخرى قد تعرف على أنها فيروس الالتهاب الشعبي لكن لا تعرف أنها نوع مصلي متخصص باستعمال الأجسام المضادة أحادية النسيلة متخصصة المجموعة للبروتينات النشوية M لفيروس الالتهاب الشعبي (8 ,16) السوائل اللقائقي من الأجنة المحقونة بالفيروس هي الأفضل في التعرف بطريقة الإليزا بالرغم من إمكانية استخدام الأنسجة المتجانسة. أُجري أيضاً التقييم باستخدام صبغة إنزيم بيروكسيداز المناعية (15) والتألق المناعي للأجسام المضادة للتعرف على الأنواع المصلية باستعمال الأجسام المضادة أحادية النسيلة لفيروس للالتهاب الشعبي.

تفاعل البلمرة ا تسلسل بطريقة النسخ العكسي

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-RCR)

التعرف **Identification**

تم تطوير نوعان من تفاعل البلمرة المتسلسل للتعرف على الأنواع المصلية لفيروس الالتهاب الشعبي. كلا النوعين يستغل الفروق في التتابع المرتبط بالنوع المصلي في تحت الوحدة S-1 من جين البروتينات النشوية للأشواك ، وتم تطوير تحليل الاختلاف في طول القطع بعد القصر الإنزيمي restriction fragment length polymorphism (RFLP)

بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل RT-PCR الذي يفرق الأنواع المصلية بناءً على الأشكال الفريدة للأحزمة في الفصل الكهربائي للقصر الأنزيمي للقطع المهضومة S-1 عقب تعظيم الجينات بتقنية RT-PCR (13). إن تقنية RFLP RT-PCR يمكن أن تستخدم بالاتفاق مع مسبار الحامض النووي الملصق بالبيوتين لاكتشاف الفيروس في سوائل البيض عقب حقن البيض بالعينات الإكلينيكية (7). يستطيع اختبار RFLP RT-PCR التعرف على كل الأنواع المصلية المعروفة لفيروس الالتهاب الشعبي وأيضاً الفيروسات المغايرة. تطورت طريقة RT-PCR لتعريف أنواع فيروس الالتهاب الشعبي المصلية (9). يستعمل بوادئ جين S-1 gene primers النوعية للأنواع المصلية Mass و Conn و Ark و JMK بالارتباط مع البادئ العام الذي يعظم كل الأنواع المصلية للفيروس. تم تطوير البوادئ للأنواع المصلية De/072/92 و California. يمكن تحديد الأنواع المصلية المغايرة الأخرى على أنها فيروس الالتهاب الشعبي باستعمال بوادئ عامة، لكن لا يمكن التعرف على النوع المصلي المتخصص. يمكن التعرف على الإصابات المتسببة بأنواع فيروس الالتهاب الشعبي المصلية العديدة. لا تعطي أي من اختبارات التعريف للأنواع المصلية بتفاعل البلمرة العكسي كما توجد الآن معلومات على ضراوة الفيروس أو إذا كانت المعزولة مشتقة من لقاحات مضعفة.

دراسات الإعداء التصالبية Cross-Challenge Studies

تمثل اختبارات الإعداء التصالبية في الدجاج إضافة مهمة للتصنيف المصلي للتوصيف الأنتيجيني للمعزولات الحقلية لفيروس الالتهاب الشعبي. إن تحصين الدجاج بالأنواع المصلية المحددة أنتيجينياً قد يحدث درجة عالية من الحماية عن المتوقعة على أساس نتائج التصنيف المصلي. يجرى بتحصين ١٠ دجاجات خالية من الممرضات النوعية عمرها من ٣ — ٦ أسابيع بواسطة التنقيط في العين بالأنواع المصلية المعلومة من فيروس الالتهاب الشعبي والإعداء بعد أربعة أسابيع بالتنقيط في العين بالمعزولة الحقلية غير المعروفة. يشمل الضوابط المناسبة في اختبارات الإعداء التصالبية. يجب أن يحمى الدجاج المحصن والذي تم تحديده بالعترة المماثلة ويكون الدجاج غير المحصن في المجموعة الضابطة والمحقون بفيروس الإعداء قابلاً للعدوى. توفر إمكانيات العزل لمنع العدوى التصالبية المهملة بين المجاميع المحصنة بالأنواع المصلية المختلفة. عادة تقيم الحماية بجمع مسحات من القصبة بعد اليوم الرابع أو الخامس بعد الإعداء وتقييمها كفيروس الإعداء بعمل محاولات العزل الفيروسي في أجنة البيض. الدجاج الذي لا يعزل منه الفيروس يعتبر محمياً أو غير مصاب. الطرق الأخرى لتحديد الحماية عقب الإعداء تشمل تقييم الآفات المجهرية في القصبة الهوائية أو قياس نشاط الأهداب في مزرعة عضو القصبة الهوائية (14).

يجب أن تستعمل المعزولات الحقلية المفاجئة أنتيجينياً كفيروسات إعداء عقب تحصين الدجاج الخالي من الممرضات النوعية بالقاح أو اللقاحات المحتوية على نوع أو الأنواع المرخصة حالياً للاستعمال في المنطقة أو القطر

حيث مكان اكتشاف المعزولة. إن نتائج هذه الدراسات سوف تبرهن على الحماية التصالبية المرتقبة للقاح أو اللقاحات ضد إعداء المعزولة الحقلية.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

أفضل طرق التشخيص المصلي للإصابة في قطعان الدجاج بواسطة إظهار استجابة الأجسام المضادة المتزايدة أو الصاعدة في المصل في الدجاج الناقه من الإصابة باستخدام اختبار الإليزا. تكشف أطقم الإليزا المتوفرة تجارياً الأجسام المضادة الشائعة لكل الأنواع المصلية للفيروس (IDEXX, Westbrook, Maine; Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.) ولا تستطيع التعرف على الأجسام المضادة الخاصة بالأنواع المصلية بواسطة عترات فيروس الالتهاب الشعبي المسؤول عن الوبائيات. رغم ذلك، الإليزا عالية القيمة وغير مكلفة وسهلة الاستخدام للتشخيص المصلي للفيروس لاستبعاد المسببات الشائعة الأخرى للمرض التنفسي مثل فيروس مرض نيوكاسيل وفيروس التهاب الحنجرة والقصبة الهوائية أو الميكوبلازما. تتوافر تجارياً الأطقم التجارية مع تسهيلات تحليل النتائج بالكمبيوتر. يستعمل نظام إليزا باستعمال أطباق المعايرة الدقيقة (٩٦ حفرة) وطريقة تخفيف المصل الفردي لتقييم الحالة المناعية في القطعان. تختبر عينات الأمصال الحادة والناقهة وتفضل من دجاج في قطيع مشتبه إصابته بفيروس الالتهاب الشعبي بواسطة الإليزا. يوصى بتخزين المصل من الحالات الحادة عند −٢٠ °م حتى الحصول على عينات المصل من الحالات الناقهة. عندئذ يمكن اختبار كلا المجموعتين من الأمصال عند نفس الوقت لتقليل التباين. إن الزيادة في عيارية الأجسام المضادة بين عينات المصل الحادة والناقهة يكون معبراً عن الإصابة بفيروس الالتهاب الشعبي. قورنت أنظمة الإليزا لقياس الأجسام المضادة للفيروس في المصل مع الفحص المصلي باستخدام التعادل الفيروسي ومنع التلازن ووجد أنها تعطي نتائج مشجعة (18 ,19).

إن استعمال اختبارات تعادل الفيروس ومنع التلازن للتشخيص المصلي لا يوصى به عموماً. هذه الاختبارات مكلفة ومجهدة للاستخدام على الأسس الروتينية أو التقليدية، بالإضافة إلى الحكم على النتائج قد يكون صعباً بسبب احتواء أمصال الدجاج على أجسام مضادة تصالبية التفاعل والناتجة من الإصابات المتعددة مع الأنواع المصلية للعترات الحقلية واللقاحية المغايرة (4). تميل الأجسام المضادة الناتجة في الدجاج الصغير لتصبح أكثر تخصصية للنوع المصلي، حيث إن التفاعلات التصالبية مع أنتيجينات التعادل الفيروسي ومنع تلازن الدم تكون شائعة في الأمهات والقطعان البياضة (11).

التفريق من العوامل الممرضة قريبة الصلة Differentiation from Closely Related Agents

قد لا تفرق الأمراض التنفسية المصاحبة مع الإصابة بفيروس الالتهاب الشعبي إكلينيكياً من الشكل التنفسي الخفيف من مرض نيوكاسيل والتهاب الحنجرة والقصبة وإنفلونزا الطيور قليلة الضراوة. في هذه الحالات، يعتمد التشخيص على العزل والتعرف على الفيروس أو إظهار الارتفاع في إنتاج الأجسام المضادة النوعية المرتبط مع النقاهة من العدوى.

تسبب العترات الضارية من فيروس مرض نيوكاسيل والتهاب القصبة والحنجرة مرضاً شديداً عن الذي يحدث في وبائيات الالتهاب الشعبي. تشاهد الأعراض العصبية والآفات الحشوية مع النفوق المرتفع في القطعان المصابة بفيروس نيوكاسيل الضاري. يحدث فيروس التهاب القصبة التهاباً نزفياً في القصبة مع نفوق مرتفع في الوبائيات الخطيرة، بالإضافة إلى أن التهاب الحنجرة والقصبة ينتشر بطيئاً في القطعان المصابة.

قد يتشابه أيضاً الزكام المعدي والإصابة بالميكوبلازما مع الالتهاب الشعبي المضاعف مع الإشريكية القولونية. ترتبط متلازمة انتفاخ الرأس مع الالتهاب الشعبي والإشريكية القولونية ومستويات غاز الأمونيا المرتفع. يلاحظ أيضاً تورم الرأس في الزكام المعدي وعدوى الميكوبلازما.

يتشابه التهاب الكلى الملحوظ في الدجاج المصاب بالعترات الممرضة للكلى مع فيروس الالتهاب الشعبي. تشاهد التغيرات الكلوية في أحوال مرضية عديدة مثل مرض جمبورو أو التسمم بالسموم الفطرية أو التسممات الأخرى.

المراجع References

1. Alexander, D. J., and N. J. Chettle. Procedures for the haemagglutination and the haemagglutination-inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 6:9-17. 1977.
2. Cowen, B. S., and S. B. Hitchner. Serotyping of Avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test. Avian Dis. 19:583-595. 1975.
3. Gelb, J., Jr., C. L. Keeler, Jr., W. A. Nix, J. K. Rosenberger, and S. S. Cloud. Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. Avian Dis. 41:661-669. 1997.
4. Gelb, J., Jr., and S. L. Killian. Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes. Avian Dis. 31:513-522. 1987.
5. Gelb, J., Jr., J. K. Rosenberger, P. A. Fries, S. S. C1oud, E. M. Odor, J. E. Dohms, and J. S. Jaeger. Protection afforded infectious bronchitis virus-vaccinated sentinel chickens raised in a commercial environment. Avian Dis. 33:764-769. 1989.
6. Gelb, J., Jr., J. B. Wolff, and C. A. Moran. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. Avian Dis. 35:82-87. 1991.
7. Jackwood, M. W., H. M. Kwon, and D. A. Hilt. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. Avian Dis. 36:403-409. 1992.
8. Karaca, K., S. Naqi, and J. Gelb, Jr. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. Avian Dis. 36:903-915. 1992.
9. Keeler, C. L., K. L. Reed, W. A. Nix, and J. Gelb. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus (IBV) by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. Avian Dis. In press. 1998.

10. King, D. J., and D. Cavanaugh. Infectious bronchitis. In: Diseases of Poultry, 9th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, and H. W. Yoder, Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 471-484. 1991.
11. King, D. J., and S. R. Hopkins. Evaluation of the hemagglutination-inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. Avian Dis. 27:100-112. 1983.
12. King, D. J., and S. R. Hopkins. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemagglutination-inhibition test. Avian Dis. 28:727-733. 1984.
13. Kwon, H. M., M. W. Jackwood, and J. Gelb, Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Dis. 37:194-202. 1993.
14. Marquardt, W. W., S. K. Kadavil, and D. B. Snyder. Comparison of ciliary activity and virus recovery from tracheas of chickens and humoral immunity after inoculation with serotypes of avian infectious bronchitis virus. Avian Dis. 26:828-834. 1982.
15. Naqi, S. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. Avian Dis. 34:893-898. 1990.
16. Naqi, S. A., K. Karaca, and B. Bauman. A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. Avian Pathol. 22:555-564. 1993.
17. Shultze, B., D. Cavanagh, and G. Herrler. Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. Virology 189:792-794. 1992.
18. Thayer, S. G., B. N. Nersessian, B. Rivetz, and O. J. Fletcher. Comparison of serological tests for antibodies against Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus using ImmunoComb® solid phase-immunoassay, a commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and the hemagglutination-inhibition assay. Avian Dis. 31:459-463. 1987.
19. Thayer, S. G., P. Villegas, and O. J. Fletcher. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays and conventional methods for avian serology. Avian Dis. 31:120-124. 1987.



الفصل الثالث والثلاثون

الفيروسات المعوية
ENTERIC VIRUSES

دونالد ل. رينولدز
Donald L. Reynolds

ا لخص Summary

تسبب الفيروسات المعوية أمراضاً في الأمعاء في الدواجن الصغيرة العمر. تشمل الأعراض السريرية المميزة الإسهال وفقدان الشهية وأكل الفرشة وانتفاش الريش. قد توجد آفات في الأمعاء وعادة تكون منتفخة وممتلئة بالسوائل والمحتويات الغازية. يحدث عادة التقزم أو ضمور الطيور كنتيجة للعدوى مما ينتج عنه قطعان غير متجانسة. العوامل الفيروسية المختلفة (أو اتحاد لهذه العوامل) يمكن أن يسبب الأمراض المعوية.

فـ وس روتا Rotavirus

فيروس روتا ليس له غلاف وله حامض نووي ريبوزي مزدوج الشريط مع مجين مقسم. فيروسات روتا ثابته جداً وتستطيع أن تظل في البيئة لفترة زمنية طويلة. يصيب الدواجن أربعة مجموعات من فيروسات روتا. يعتبر الفيروس الأكثر تكراراً هو فيروس روتا المجموعة D. توجد المجموعة A في الدواجن لكن عامة لا تكون ضارية مثل مجموعة D أيضاً.

تعريف ا سبب Agent Identification

يمكن أن يجرى تشخيص الإصابة بفيروس روتا بواسطة رؤية جزيئات فيروس روتا من الأمعاء أو زرق الطيور المصابة. توجد طريقتان عمليتان وأكثر شيوعاً للتفريق بين مجموعات الفيروس وهي المجهر الإلكتروني المناعي (IEM) وتصنيف المجين بواسطة الفصل الكهربائي genome electropherotyping.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

طور عدد من التحاليل للكشف عن الأجسام المضادة في المصل لفيروس روتا تشمل الإليزا والترسيب في الآجار والمجهر الإلكتروني المناعي وتعادل المصل والفيروس. تعتمد هذه القياسات على الفيروس المنقى ليستخدم كأنتيجين أو في حالة تعادل الفيروس، يتم تكاثر فيروس روتا في نظام مزارع الخلية. العوامل المحددة التي تشجع استخدام القياسات المصلية لفيروس روتا هي عدم قابلية المجموعة D من فيروس روتا للتكاثر بكميات كبيرة بالوسائل خارج الجسم الحي.

الف وسات التاجية Coronaviruses

هي فيروسات لها غلاف ولها حامض نووي ريبوزي مفرد الشريط وتسبب مرضاً معوياً أساساً في الرومي (مرض العرف الأزرق). الفيروس التاجي يمكنه أن يصيب الرومي في أي عمر وينشأ عنه إسهال شديد وجفاف وضمور. يمكن أن تسبب الفيروسات التاجية زيادة في نفوق القطيع (أكثر من ٥٠٪) وهو الأمر المميز وغير الملحوظ عامة مع الفيروسات المعوية الأخرى.

تعريف ا سبب Agent Identification

يجرى التشخيص بدقة بعزل الفيروس في أجنة البيض ويعقبه خاصية التلازن الدموي والفحص المجهري الإلكتروني للفيروس المنقى. بدلاً من ذلك، يمكن استخدام التحاليل القائمة على المناعة مثل المجهر الإلكتروني المناعي لتجهيزات الفيروس المنقى أو اختبار الأجسام المضادة المتألقة في أمعاء الأجنة المصابة.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمكن استخدام اختبار التألق المناعي غير المباشر لكشف الإصابات في قطعان الرومي.

عامل متلازمة التقزم Stunting Syndrome Agent (SSA)

تم التعرف عليه حديثاً ولم يصنف تقسيمياً وهو عامل فيروسي غشائي يسبب الإسهال والتقزم في الرومي.

تعريف ا سبب Agent Identification

يمكن أن يعزل عامل متلازمة التقزم بالإكثار في أجنة الرومي. يمكن تفريق الفيروس النقي عندئذ من الفيروسات الغشائية الأخرى اعتماداً على خاصية التلازن الدموي.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

حالياً لا يستعمل تحليل مصلي لعامل متلازمة التقزم.

الف وسات النجمية Astroviruses

تسبب مرضاً معوياً خفيفاً في الرومي وغير مصاحبة بزيادة في النفوق. توجد هذه الفيروسات أكثر شيوعاً متحدة مع الفيروسات الأخرى خاصة مجموعة D من فيروسات روتا.

تعريف ا سبب Agent Identification

حالياً المجهر الإلكتروني المناعي هو أكثر طريقة تناسب تشخيص إصابات الفيروس النجمي.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

لا يوجد حالياً تحليل مصلي يستخدم لكشف إصابة الفيروس النجمي في الدواجن.

الف وسات ا عوية Enteroviruses

تسبب مرضاً معوياً في الرومي والدجاج. تشبه فيروسات روتا والفيروسات النجمية، ولا ترتبط مع زيادة النفوق، ولوحظت بالاشتراك مع الفيروسات المعوية الأخرى.

تعريف ا سبب Agent Identification

يمكن أن تعزل في أجنة البيض. المجهر الإلكتروني المناعي ذو فائدة في تشخيص إصابات الفيروس المعوي.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

لا يوجد حالياً فحص مصلي يستعمل لاكتشاف إصابات الفيروس المعوي في الدواجن.

مقدمة Introduction

تسبب الأمراض المعوية التي تحدث في الطيور صغيرة العمر (أقل من ستة أسابيع) مشاكل لمنتجي الدواجن. يتشارك عدد من الفيروسات مع الأمراض المعوية للطيور الصغيرة (15 ,17). بعض من هذه الفيروسات تكون ممرضات معوية ؛ إلا أن الدور الذي تلعبه هذه الفيروسات في المرض المعوي لم يتحدد بعد. على سبيل المثال : في

الرومي يعرف مرض شائع على أنه مرض العرف الأزرق ويتسبب بواسطة الفيروس التاجي، إلا أن حالات شبيهة في الرومي تعرف بالالتهاب المعوي في الرومي الصغير أو الالتهاب المعوي الفيروسي في الرومي ارتبطت مع الإصابة بفيروس روتا والفيروس المعوي والفيروس النجمي. حالات شبيهة في الدجاج أُرجعت عموماً لمتلازمة ضعف الامتصاص malabsorption ومتلازمة التقزم وأسماء عديدة أخرى اشتركت مع عوامل فيروسية متعددة تشمل فيروس الريو والفيروسات المعوية. تحدث أيضاً متلازمة التقزم في صيصان الرومي وحديثاً تم التعرف على العامل المسبب لهذا المرض (1). منذ نشر الطبعة الثالثة من هذا الكتاب، أُرجع المرض غير المحدد السبب الحادث في صيصان الرومي عادة على أنه متلازمة النفوق الشوكي spiking mortality أو متلازمة الالتهاب المعوي والنفوق في الرومي pout enteritis mortality syndrome (PEMS) (10).

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

يختلف المرض الإكلينيكي بالنظر إلى حدة الأعراض السريرية اعتماداً على العامل أو العوامل المسببة ونوع الطائر المصاب، إلا أنه هناك عدد من الخصائص تكون شائعة بين كل إصابات الفيروس المعوي. يحدث المرض الإكلينيكي أكثر شيوعاً خلال الأسبوع الثاني أو الثالث من الحياة وينتهي خلال ١٠ - ١٤ يوماً. ومن ثم تتعافى معظم الطيور المصابة بمرض الفيروس المعوي من الأعراض بمرور ستة أسابيع من العمر. يلاحظ كثيراً استثناء الالتهاب المعوي نتيجة للفيروس التاجي في الرومي وفيه يكون الرومي الكبير أيضاً قابلاً للإصابة.

تشمل الأعراض السريرية المميزة الإسهال (الزرق المائي) والخمول وأكل الفرشة والارتخاء والأنواع المختلفة للالتهابات المعوية. يمتلئ الجهاز المعوي عادة بالمحتويات المائية والغازات وفي بعض الحالات غذاء مهضوم جزئياً. ينتفخ الأعور عادة ويمتلئ بالغازات والمحتويات الرغوية. يتباين النفوق ويعتمد على العامل أو العوامل المسببة ونوع الطائر المصاب. قد يتراوح النفوق من خفيف فقط إلى زيادة متوسطة، إلا أنه مع الإصابات بالفيروس التاجي في الرومي وحالات PEMS، سجلت خسائر حتى ٥٠٪ أو أكثر (7, 10, 14). تمثل الإصابة كنتيجة لتناقص النمو (التقزم) المشكلة الرئيسية. نمطياً يصبح ٥٪ - ٢٠٪ من القطيع الذي حدث به مرض فيروسي معوي متقزم ويظل هكذا طول أو على مدى فترة النمو.

ع العينات Sample Collection

تجمع العينات المعوية من الطيور التي بها مرض إكلينيكي (إسهال... إلخ) وتكون ذات فائدة كبيرة لعزل وتعريف معظم الفيروسات المعوية. يجب أن يؤخذ الجهاز المعوي من الطيور في حالته الكاملة بداية من النقطة حيث يلتقي الاثنا عشر مع المعدة الغدية ويستمر حتى منطقة المجمع أو الجزء من الجهاز المعوي المتبقي بعد منطقة المعدة

الغدية. تكفي الأجهزة المعوية لعدد ٥ – ١٠ طيور للعزل وتوضع في إناء معقم أو خالٍ من الملوثات الفيروسية. تقطع الأمعاء إلى قطع صغيرة من ٢ – ٥ سم طول عند وضعها في الأواني المعقمة وهذا يساعد أو يسمح بالحصول على محتويات الأمعاء بشكل أسهل. يمكن أن تخزن العينات أو ترسل بواسطة التجميد عند –٢٠° م. عند التخزين لوقت طويل تقسم العينات إلى أقسام صغيرة وتحفظ عند –٧٠° م. يجب تجنب التجميد والإذابة المتكررة للعينات لأن هذا قد يحدث موت بعض الفيروسات. تعتبر المحتويات المعوية مصدراً مهماً للمواد المصابة بالفيروس. على الرغم أن ربط الجهاز المعوي ليس ضرورياً لكنه يجب منع محاولات تفريغ المحتويات المعوية.الأجهزة المعوية المثبتة في الفورمالين أو المثبتات الأخرى قد تكون محدودة القيمة لأن التثبيت عادة يؤدي إلى قتل الفيروسات.

عامة، الفيروسات غير المغلفة مثل فيروسات روتا وريو والنجمية والفيروسات المعوية تكون مقاومة جداً والتجميد له تأثير ضئيل عند حفظها، إلا أن الفيروسات الغشائية مثل فيروسات كورونا عامل متلازمة التقزم قد يفقد إمراضيته عند التخزين طويل الأمد. يتطلب تجهيز العينات المعوية لعزل وتعريف الفيروس الخطوات التالية:

١) تجميد وإذابة العينات على الأقل ثلاثة مرات. هذا يساعد في تمزيق الخلايا المعوية التي تحمل الفيروس ويحطم الأنسجة للتداول الأسهل للعينة. تلغى هذه الخطوة عند محاولة عزل الفيروسات الغشائية أو المغلفة للسبب السابق ذكره.

٢) تخفف العينات بمحلول منظم ملح الفوسفات بي إتش ٧,٤. يمكن استعمال مخففات أخرى إلا أن محلول الملح الفوسفاتي أكثر شيوعاً واقتصادياً. تعتمد كمية المخفف على العينة. في حالة العينات المفككة المائية أو عينات الإسهال تحتاج إلى تخفيف أقل من العينات المكونة من مواد الزرق الصلبة. نمطياً التخفيف من نسبة ١ : ١ حتى ١ : ٥ (العينة : المخفف) يكون كافياً.

٣) تجانس العينة بعدد من الطرق. الأكثر شيوعاً من خلال وضع الأكياس التي تحتوي على العينات والمخفف في جهاز الطحن النسيجي stomacher لمدة ثلاث دقائق. باستخدام هذه الطريقة تظل العينة في وعائها الأساسي ومن ثم تقل خطورة تلوث المعمل والأشخاص. يمكن بهذه الطريقة تجهيز عدد من العينات بسرعة بدون ضرورة لمعدات التنظيف. الطريقة السهلة الاقتصادية البديلة هي استخدام أسطوانة أو بكرة لصق ورق الحائط للضغط على العينة داخل كيسها الأساسي فوق سطح مائدة. الطرق الأخرى لمجانسة الأنسجة مثل استعمال طاحن الأنسجة أو خلاط كهربي.

٤) يمكن أن تعرض للموجات الصوتية في حمام ثلجي لمدة تتراوح من ١ – ٢ دقيقة. ويجب أن يتم ذلك لمدة ٣٠ ثانية ثم يتبعها ٣٠ ثانية بدون موجات صوتية أو على فترة ٣٠ ثانية لتبديد الحرارة الناتجة من الموجات الصوتية. يساهم التعرض للموجات الصوتية في تحرير الفيروسات من الأنسجة والمواد العضوية وأيضاً يساعد انتشار تجمعات الفيروس. يجب الحرص عند استخدامه لأن ذلك قد يؤثر على الفيروسات الغشائية أو المغلفة

ويجب أن تلغى هذه الخطوة عند توقع عزل الفيروسات المغلفة. بالإضافة إلى ذلك تفصل الموجات الصوتية النسيج من البكتيريا التي تكون موجودة في العينة، وقد يمثل مشاكل محتملة ومن ثم يمكن اختبار إلغاء عملية التعريض للموجات الصوتية أو إجراؤها بعد إزالة البكتيريا من العينة.

٥) ترسب العينة بالطرد المركزي بين ٤٠٠ — ٥٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة. يحفظ الرائق ويستعمل لتجهيزات أكثر. لا يجب التخلص من الراسب لأنه قد يحتوي أو يحتفظ بكميات من الفيروس يمكن تقديرها.

٦) يرشح الرائق خلال مرشح ٠,٤ μm. عادة ترشيح الرائق خلال مرشحات كبيرة (مثل ١,٢ μm أو ٠,٦٥ μm) ينصح به قبل محاولة الترشيح خلال مرشح ٠,٤ μm. تفيد المحاقن الإيجابية الضغط ذات المرشح في هذه الطريقة. إذا كانت العينة صعبة الترشيح، يمكن أن تكرر خطوة التصفية (انظر خطوة ٥ سابقاً) بزيادة قوة الطرد المركزي حتى ٥٠٠٠ إكس جي. يمكن أن يجمد الراشح المجهز بالموجات الصوتية ويخزن. قد يكون التجميد والإذابة المتكررين لهما تأثيرات غير مرغوبة على بعض الفيروسات، ومن ثم ينصح بتقسيم العينات المجهزة إلى أقسام صغيرة قبل تجميدها. إن جمع أنسجة إضافية أو استعمال طرق أخرى قد يكون ذا فائدة عظيمة اعتماداً على العامل النوعي المعتقد في وجوده.

بيئات الزرع ا فضلة Preferred Culture Media and Substrates

الف وسات التاجية Coronaviruses

يمكن تنمية الفيروس التاجي المعوي الخاص بالرومي في أجنة بيض الدجاج أو الرومي التي عمرها أكبر من ١٥ يوماً. يجب أن يحضر الطعم من محتويات الأمعاء و/أو نسيج البيرسا فايريسي من صغار الرومي المشتبه فيها. يحضر الطعم من نسيج بيرسا بمجانسة النسيج أولاً ثم الطحن في طاحن الأنسجة. يخفف الخليط المتجانس بمحلول ملح الفوسفات المعقم حتى الحجم المطلوب. التنقية بسرعة قليلة لإعداد البيرسا بالطرد المركزى لمدة ٣٠ دقيقة عند ٥٠٠ إكس جي يعقبها الترشيح للرائق خلال مرشح ٠,٤ μm ثم تضاف المضادات الحيوية (مثل البنسلين وستربتومايسين كما في الفصل الثالث والأربعون عن تنمية الفيروسات في أجنة البيض) إلى الطعم قبل الحقن. تستعمل الطريقة التالية لعزل الفيروسات التاجية في أجنة الرومي عند عمر ٢٣ — ٢٤ يوماً:

١) ينشط التربسين الطعم. أضف ١٠ ميكروجرام/مل من تربسين النوع XIII (شركة سيجما) إلى الطعم وحضن عند ٣٧°م لمدة ساعة على الأقل.

٢) جهز البيض بالتطهير عند الغرفة الهوائية باستخدام الكحول أو اليود (انظر الفصل الثالث والأربعون).

٣) اقطع ثقب قطره ٠,٧٥ بوصة (٢ سم) في طرف غرفة الهواء للبيضة.

٤) ضع ٢ – ٣ نقطة (٠,٥ مل) لكل بيضة من ١٥٪ محلول كحول إيثيلي (في ماء معقم) على غلاف القشرة– الغشاء الكوريوالانتويس. هذا يسمح برؤية الجنين خلال الغشاء.

٥) باستخدام إبرة مقاس ٢٦ ، اغرس الإبرة خلال غشاء القشرة والغشاء الكوريوالانتويس بحرص لتجنب الأوعية الدموية وجسم الأجنة (مثل العين... إلخ). اغرس الإبرة بعيداً بدرجة كافية للتأكد أنها خلال الأغشية واحقن ٠,١ – ٠,٢ مل من الطعم تحت الأغشية.

٦) أزل الإبرة وغطِّ الثقب بالبارفين أو شريط سوليفان. أعد أو أرجع الأجنة المحقونة إلى مفقس البيض باستعمال الحرارة والرطوبة المثالية للتفقيس.

يمكن إعادة عزل الفيروس التاجي ٣ – ٥ أيام عقب الحقن من أمعاء الجنين والمح ونسيج بيرسا فابريسي عند المجمع. يمكن أن تجهز هذه المواد بكمية إضافية لتمرير إضافي وتحفظ عند –٧٠° م أو تفحص لوجود الفيروس.

تنمو فيروسات الرومي التاجية في خط خلايا سرطان المستقيم في الإنسان ويرمز له HRT-18 (5). إن التنشيط بالتربسين ودمج التربسين إلى بيئة الحفظ maintenance media يكون مطلوباً لنمو الفيروس. يمكن أن يحضر الطعم الفيروسي كما سبق وصفه لحقن أجنة البيض. قد يتطلب عدة تمريرات للفيروس التاجي للرومي قبل ظهور التأثير المرضي الخلوي والذي سجل أنه يحدث من ١٤ - ٧٢ ساعة عقب الحقن. لمعرفة الوصف التفصيلي للتأثير المرضي الخلوي الذي يحدث بواسطة الفيروس التاجى للرومي في خلايا HRT-18 انظر Dea *et al.* (3). إضافة إلى ذلك لا تتأقلم معزولات الفيروس التاجي لخلايا HRT-18 ومن ثم قد تكون هذه الطريقة ذات استخدام محدود اعتماداً على المعزولة محل السؤال.

عامل متلازمة التقزم Stunting Syndrome Agent

يمكن تنقية هذا المسبب في أجنة الرومي بنفس الطريقة مثل الفيروس التاجي الموصوف أعلاه. تستعمل عينات محتويات الأمعاء. التنشيط بالتربسين النوع IX (شركة سيجما) باستعمال أي من ١٠ أو ٢٠ ميكروجرام/مل يكون ضرورياً. عامل متلازمة التقزم يحدث آفات نمطية في أمعاء الأجنة من ٣ – ٥ أيام عقب الحقن. مثالياً يكون الجهاز المعوي متمدداً وممتلئاً بالسوائل. يمكن جمع عامل متلازمة التقزم من السوائل المعوية.

ف وسات روتا Rotaviruses

تنمو فيروسات روتا الطيور مجموعة A (انظر أسفل لتقسيم المجموعة) في مزارع خلايا كلى الدجاج والرومي وكبد أجنة الدجاج الأولية ، إلا أن خط الخلايا المستمر المشتق من أجنة كلى قردة ريسوس والتي يرمز لها MA104 cell line هو أوسع طريقة شائعة وواسعة الاستخدام لعزل وتنمية هذه الفيروسات.

الأنابيب الأسطوانية شائعة الاستخدام للتنمية الأولية لمعزولات فيروس روتا على الرغم من أنه عند تنمية كمية كبيرة من الفيروس يمكن استخدام زجاجات أسطوانية بسهولة. يمكن أيضاً للمزارع الثابته لخلايا MA104 أن

تساند نمو فيروس روتا الطيور والدوران المستمر للمزارع (مع الأنابيب أو الزجاجات الأسطوانية) يساهم في عزل ونمو فيروس روتا.

تنشيط فيروسات روتا بالتربسين يكون ضرورياً للنمو في مزرعة الخلية وأيضاً في دمج التربسين إلى بيئة الحفظ ويستعمل تربسين النوع IX كثيراً في التنشيط. ليس لكل أنواع تربسين IX نفس النشاط. تتأثر كمية التربسين بعوامل مثل العمر والألواط الصناعية المختلفة. من ثم يحتاج الأمر إلى معايرة كمية التربسين في بيئة الحفظ قبل حقن الفيروس. يجرى هذا بخلط التركيزات المختلفة من التربسين (عادة ٠,٥ ، ١ ، ١,٥ ، ... ، ٤ مجم/مل) إلى بيئة الحفظ واستخدام هذه البيئة في أنابيب أسطوانية تحتوي على خلايا الطبقة الواحدة MA104 المندمجة غير المحقونة بالفيروس. عادة خلال ساعات تسبب التركيزات المرتفعة من التربسين انفصال الطبقة الواحدة من زجاج الأنبوبة الأسطوانية. التركيز المثالي من التربسين في الاستخدام في بيئة الحفظ هو التركيز الذي يترك على الأقل ٥٠٪ من الطبقة الواحدة ملتصقاً إلى الزجاج بعد ٢٤ ساعة.

لا يتم تنمية أو عزل فيروسات روتا الأخرى غير فيروسات روتا مجموعة A روتينياً على مزارع الخلية. إن العزل والنمو لهذه الفيروسات محدد بالعدوى عن طريق الفم في طيور معروف خلوها من الممرضات المعوية الأخرى (يحبذ الطيور الخالية من المسببات المرضية) مع تجهيز هذه العوامل. يمكن إعادة عزل الفيروس من الجهاز المعوي لهذه الطيور من ٣ — ٦ أيام عقب الحقن.

يمكن استعمال الطريقة الآتية لعزل وتنمية فيروسات روتا مجموعة A في مزرعة الخلية :

١) تزرع خلايا MA104 في أنابيب ذات غطاء حلزوني وتنمى حتى الاندماج باستخدام بيئة إيجل Eagle's minimum essential medium (EMEM) أو بيئة دلبيكو Dulbeco modified Eagle's medium (DMEM) والمزودة بتركيز ١٠٪ من مصل أجنة الأبقار ومضادات حيوية (٥٠ وحدة دولية/مل من البنسلين و٠,١٢٥ ميكروجرام/مل من أمفوتربسين B). إذا كانت الأنابيب حلزونية الغطاء محكمة الغلق فإنها لا تحتاج إلى تحضينها تحت ظروف مزودة بثاني أكسيد الكربون. تحضن كل المزارع عند ٣٧ْ م.

٢) يجب أن تغسل خلايا الطبقة الواحدة ببيئة خالية من المصل (أو محاليل ملح متزنة أخرى) ثلاث مرات لإزالة أي بقايا لمصل أجنة العجول الذي قد يثبط الفيروس أو يمنع نشاط التربسين المضاف.

٣) يجهز الطعم المحتوي على الفيروس من الراشح المعرض للموجات كما وصف سابقاً. يجب أن ينشط الطعم بالتربسين أولاً قبل حقنه في الخلايا وحيدة الطبقة ويكون هذا بإضافة التربسين النوع IX إلى تركيز نهائي من ١٠ — ٢٠ مجم/مل من الطعم. قد تحتوي بعض العينات مواداً سامة للخلايا وفي هذه الحالة تخفف العينات ١ : ٢٥ أو ١ : ٥٠ بالبيئة الخالية من المصل وبعد ذلك يضاف التربسين.

٤) يوضع الطعم المجهز سابقاً إلى الخلايا وحيدة الطبقة. يستخدم للأنابيب حلزونية الغطاء ٠,٢ مل من الطعم لكل أنبوبة. يمكن أن تدور الأنابيب باليد مرة كل ١٠ — ١٥ دقيقة أو توضع مباشرة إلى جهاز أسطوانة دائرية وتدور أو تهز بطريقة دائرية. فترة الحقن تكون ساعة.

٥) عقب الحقن، تغسل الخلايا بالبيئة الخالية من المصل لإزالة أي بقايا للطعم. تضاف بيئة الحفظ المتكونة من EMEM أو DMEM خالية من المصل وتحتوي على المضادات الحيوية مع ١ — ٢ ميكروجرام/مل من تربسين نوع IX لكل أنبوبة.

٦) تحضن الأنابيب لمدة ٤٨ — ٧٢ ساعة قبل الحصد. يشاهد التأثير المرضي الخلوي نمطياً خلال ٢٤ ساعة من الحقن، إلا أن التمرير الأعمى المتعدد للمعزولات الأولية قد يكون مطلوباً قبل ملاحظة التأثير المرضي الخلوي، وللوصف الكامل للتأثير المرضي الخلوي لفيروس روتا في خلايا MA104 انظر Theil *et al.* (20).

٧) يجمع الفيروس بين ٤٨ و ٧٢ ساعة عقب الحقن. تجمد الأنابيب المحتوية على الخلايا عند —٢٠ °م أو أقل وتذاب وتعرض للموجات الصوتية وتنقى بالطرد المركزي عند سرعة منخفضة. الفيروس الموجود في الرائق يمكن أن يستعمل لتمرير إضافي ثم التنقية وهكذا.

فـ وسات ريو Reoviruses

يمكن أن تنمى بطرق مزرعة الخلية. لمعلومات إضافية ارجع إلى الفصل الثامن والثلاثون عن التهاب المفاصل الفيروسي وفيروسات ريو الأخرى.

الفـ وسات ا عوية الصغـ ة Small Enteric Viruses

يمكن أن تنمى الجزيئات شبيهة الفيروس المعوي Enteroviruslike particle جسيمات من الدجاج تسلسلياً بالحقن في الغشاء الكوريوالانتويس السقائي في أجنة البيض. يمكن أن تنمى الجزيئات شبيهة الفيروس المعوي من الرومي بالحقن في أجنة بيض الرومي عند عمر ١٨ يوماً بطريق كيس المح ويجمع الجهاز المعوي ستة أيام عقب الحقن(9). يمكن أن يجهز الطعم من محتويات الأمعاء كما وصف بأعلى (انظر جمع العينات). طرق حقن الغشاء الكوريوالانتويس وكيس المح تم وصفها في الفصل الثالث والأربعون.

الفيروسات المعوية الأخرى الصغيرة مثل الفيروسات النجمية وفيروسات بارفو وفيروسات بيكوآر إن إيه الكاذبة pseudopicornaviruses والأخرى لا تنمو روتينياً في مزرعة الخلية أو أجنة البيض. عادة يجرى عزل وتنمية هذه العوامل بالعدوى عن طريق الفم في الطيور القابلة للإصابة ويعاد عزل الفيروس من أجهزتها المعوية.

تعريف ا سبب Agent Identification

استعملت عدد من التقنيات لتعريف الفيروسات المعوية. عرف العديد منها أولاً بالرؤية المباشرة للفيروس باستعمال المجهر الإلكتروني. وقد يكون تطبيق هذه الطريقة هو التقنية المفضلة أو قد تكون الوحيدة المتاحة لتعريف وكشف عديد من الفيروسات المعوية. ينصح أو يشار بالمجهر الإلكتروني المناعي (IEM) لتعريف العديد من الفيروسات المعوية خاصة هذه التي يعرف القليل عن خصائصها الفيزيائية الكيميائية. التكلفة والإتاحة وغيرها ربما تحد من استعمال المجهر الإلكتروني في التشخيص الروتيني للفيروسات المعوية. تقنيات أخرى مثل التألق المناعي والتصنيف بالفصل الكهربائي للمجين الفيروسي والإليزا والتلازن الدموي يستخدم لكشف بعض الفيروسات المعوية. أكثر الطرق المستخدمة شيوعاً للكشف ودراسة الخصائص الفيزيوكيميائية الرئيسية للفيروسات المعوية توصف أسفل.

الف وسات التاجية Coronaviruses

الفيروس التاجي المعوي في الرومي (عامل العرف الأزرق) هو فيروس آر إن إيه مفرد الشريط يتراوح حجمه من ٥٠ – ١٥٠ نانوميكروناً، وله غشاء حساس لمذيبات الدهون وهي بروزات سطحية مثل التاج مميزة للفيروسات التاجية. قد يساهم هذا الغشاء أيضاً في الشكل المتعدد للفيروس. يقاوم الفيروس الحرارة عند ٥٠ °م في غياب أيونات كلوريد الماغنسيوم الثنائية لكن حساس للحرارة في وجودها. الفيروس ثابتاً عند بي إتش ٣

تدل التقارير عن التباين في العترة لمعزولات الفيروس التاجي المعوي في الرومي أنها تكون متشابهة أو تكون قريبة الصلة جداً (5 ,14)، إلا أن التقارير الحديثة تقترح أن بعض هذه الفيروسات في الرومي قد يكون لها علاقة أنتيجينية لفيروس الالتهاب الشعبي الطيري (11).

اختبار تلازن الدم Hemagglutination Test

تستطيع هذه الفيروسات أن تلزن خلايا الدم الحمراء لخنازير غينيا والأرانب. تستعمل هذه الخاصية لكشف ومعايرة الفيروسات التاجية للرومي التي يتم عزلها وتنميتها في أي من أجنة البيض أو مزرعة الخلية. يستعمل معلق ٠,٥٪ من خلايا الدم الحمراء وتخلط مع حجم متساوٍ من الأنتيجين. يجب أن يجرى الاختبار عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة. يجب أن يجرى تركيز وتنقية الأنتيجين (الفيروس) قبل الاختبار. للوصف التوضيحي لطريقة تركيز وتنقية الأنتيجين انظر .Dea *et al* (4).

اختبار التألق للأجسام ا ضادة Fluorescent Antibody Test

اختبار التألق المناعي ذو فائدة في كشف الفيروسات التاجية من الجهاز المعوي للأجنة المصابة أو صغار الرومي. تؤخذ قطاعات من الجهاز المعوي عند الفحص التشريحي وتجمد سريعاً وتخزن عند −٢٠° م أو أقل حتى تجهز للاختبار بواسطة التقطيع في الحالة المتجمدة cryostat sectioning. يستطيع هذا الاختبار المباشر أن يكشف الأنتيجين للفيروسي التاجي خلال ٢٤ ساعة عقب العدوى. يلاحظ في صغار الرومي الكشف الأنتيجيني متأخراً حتى ٢٨ يوماً عقب العدوى.

اختبار الإليزا Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

استخدم اختبار الإليزا بالجسم المضاد بنجاح لكشف الفيروسات التاجية من محتويات أمعاء صغار الرومي. انظر Dea and Tijssen للمعلومات الإضافية حول هذه الطريقة (5).

عامل متلازمة التقزم Stunting Syndrome Agent

هو فيروس مغلف غير مصنف نصف قطره من ٦٠ – ١١٠ نانوميكرونات. هو متعدد الأشكال وله بروزات سطحية ونيوكليوكابسيد على شكل القرص المنحني أو شكل الكلية ويستطيع أن يلزن خلايا الدم الحمراء للفأر عند ٤° م ودرجة الغرفة لكن ليس عند ٣٧° م. هذه هي الصفات التي تفرق بين عامل متلازمة التقزم والفيروس التاجي في الرومي الذي يلزن خلايا الدم الحمراء لخنزير غينيا والأرنب.

ف وسات روتا Rotaviruses

هي فيروسات آر إن إيه مزدوجة الشريط تتراوح في الحجم من ٦٠ – ٧٥ نانوميكروناً وقد تلاحظ كجزيئات مزدوجة الغلاف تتراوح في الحجم التقريبي من ٧٠ – ٧٥ نانوميكروناً أو كجزيئات مفردة الغلاف تتراوح في الحجم التقريبي من ٦٠ إلى ٦٥ نانوميكروناً. لها شكل مميز والذي يساهم في التعرف عليها. لمعلومات أكثر انظر Devitt and Reynolds (6) أو McNulty (12) أو Theil *et al.* (20). كثافة الطفو لفيروسات روتا في كلوريد السيزيوم تكون تقريباً ١,٣٦ جم/سم^{٣} للجزيئات مزدوجة الغطاء و١,٣٨ جم/سم^{٣} للجزيئات مفردة الغطاء.

يمكن استخدام عدد من الاختبارات للتعرف على فيروسات روتا. الأكثر شيوعاً في التقنيات المستعملة هو التألق المناعي والمجهر الإلكتروني المناعي، لكن يستعمل التصنيف بالفصل الكهربي أيضاً بواسطة بعض المختبرات. بالإضافة إلى الاختبارات التي تستطيع كشف فيروسات روتا المتوفرة تجارياً. أمثلة لبعض هذه الاختبارات التي تشمل اختبار تلازن اللاتكس latex agglutination والإليزا. كما كتب سابقاً تُوجه أطقم التشخيص المتاحة تجارياً إلى

كشف فيروسات روتا الثديات المجموعة A وهي ذات فائدة محدودة لأنها لا تستطيع كشف مجموعة D أو فيروسات روتا الطيور الأخرى. لمعلومات إضافية على كيفية إجراء تقنيات التألق المناعي المباشر انظر Gardner (8).

تقسيم هذه الفيروسات تبعاً للمجموعة اعتماداً على التحليل المصلي (انظر أسفل في المجهر الإلكتروني المناعي) والتصنيف بالفصل الكهربي للمجين (انظر الفصل الكهربائي الهلامي في الأكريلاميد لفيروسات روتا الطيور آر إن إيه بأسفل). حتى الآن تم التعرف على أربع مجموعات من فيروسات روتا الطيور التي تصيب أنواع الطيور. المجموعة التي تعزل أكثر شيوعاً من الرومي هي مجموعة D وتدعى شبيهة فيروس روتا و/أو نظير فيروس روتا. المجموعة الأخرى التي تعزل بصورة متكررة من الطيور هي مجموعة A.

ا هر الإلكترو ا ناعي Immune Electron Microscopy (IEM)

تستخدم الطرق التالية لكشف فيروسات روتا.

١) تحضير مضادات الأمصال: يمكن أن تستخدم مضادات أمصال من طيور ناقهة من الإصابة (يفضل أن تكون طيوراً خالية من الممرضات النوعية) أو مضادات أمصال فائقة المناعة من حيوانات محقونة. قبل استخدامها تثبط الأمصال حرارياً عند ٥٦ °م لمدة ٣٠ دقيقة وتخضع للطرد المركزي فائق السرعة عند ٤٥٠٠٠ إكس جي لمدة ٤٥ دقيقة، وتعقم بالترشيح وتوزع في عبوات صغيرة ويمكن أن تحفظ عند ٤ °م. يجرى تحديد لأمثل محلول للاختبار بواسطة الأمصال المخففة تسلسلياً في محلول فوسفات معقم وعمل باقي طريقة المجهر الإلكتروني المناعي. نمطياً تتراوح محاليل العمل من الأمصال من الطيور الناقهة من ١ : ٥٠ إلى ١ : ٢٠٠ (مصل: محلول فوسفات). عادة تكون الأمصال فائقة المناعة أعلى تخفيفاً.

٢) تجهيز العينة: عند فحص العينات المعوية، الأجهزة المعوية يمكن أن تجهز كما وصف سابقاً (انظر جمع العينات). يستخدم الراشح الناتج من المعاملة بالموجات الصوتية لباقي الطريقة في حالة استخدام مزرعة الخلية يستعمل الرائق المجموع من الخلايا المصابة.

٣) تحضين العينة ومضادات المصل: أفضل حجم كلي من العينة مع مضاد المصل المجهز هو ٠,٥ - ١ مل. نسب العينة إلى مضادات المصل عامة بين ٢ : ١ و ٤ : ١ (مثال ٠,٥ مل عينة + ٠,٢ مل مضاد المصل). يمكن أن يختلف التحضين أيضاً اعتماداً على العينة ومضاد المصل المستخدم. لأقصى تأثير يحضن الخليط عند ٤ °م طوال الليل على الرغم أن التحضين لمدة ساعة عند درجة الغرفة عادة يكون كافياً.

٤) يعبأ مركب الفيروس والجسم المضاد بالطرد المركزي فائق السرعة عند ٥٥٠٠٠ إكس جي لمدة ٤٥ دقيقة في حالة ما إذا كانت العينة من العينات المعوية (أو مواد مشابهة)، وقد تحتوي على رواسب غير مرغوبة وقد تتداخل مع التجهيز النهائي عند الفحص بالمجهر الإلكتروني. لإزالة مثل هذه الرواسب يمكن إجراء التعبئة في

طبقة من ٤٠٪ - ٦٠٪ من السكروز. تعمل طبقة السكروز كحاجز لإمساك الرواسب قليلة الكثافة. لا تستخدم طبقة السكروز إذا كانت العينة نقية نسبياً (مثل الفيروس النامي على مزرعة الخلية) لأن بعض الرواسب تساعد في نشر العينة المصبوغة على الشبكة (انظر أسفل). إضافة إلى ذلك قد يعمل السكروز لحجز الفيروسات مع الكثافات المنخفضة (مثل بعض الفيروسات الغشائية) في حالة ترسيب مركب العينة ومضاد المصل على طبقة من السكروز، ويجب أن يغسل السكروز من العينة بواسطة استبعاد الرائق (المحتوي على السكروز) ويعاد تعليق المركب المعبأ في محلول ملح الفوسفات وتعبأ كما سبق.

٥) إعادة تعليق تجهيزات العينة: عقب الطرد المركزي الفائق، يستبعد الرائق ويمكن أن يعاد تعليق المركب المعبأ في ماء معقم عالي النوعية أو محلول تريس (بي إتش ٧,٢). لاحظ أن أنابيب الطرد المركزي الفائق يجب أن تحدد قبل الطرد لتحديد مكان الراسب المعبأ لأن الراسب المعبأ المرئي نادراً ما يكون معروفاً. يجب أن يعاد تعليق الراسب في قطرة (بواسطة ماصة باستير) من المخفف المختار.

٦) صبغة العينة المجهزة بالصبغة السالبة: تضاف إلى القطرة المحتوية الراسب المعبأ المعلق قطرة من صبغة حمض فوسفوتنجستيك ٣٪ (PTA) بحيث يكون تركيز العينة النهائي ١,٥٪ تقريباً. تحضر صبغة حمض فوسفوتنجستيك بإضافة ٣ جم من الحمض إلى الماء عالي الدرجة وتضبط درجة الأس الهيدروجينى إلى ٧,٢ — ٧,٤ باستخدام محلول ١ عياري من هيدروكسيد البوتاسيوم. يمكن أن يرشح المحلول النهائي في مرشح مقاس ٠,٢٢ ميكروميتر ويحفظ في وعاء عالي الحماية. تساعد المواد البروتينية (مثل الجسم المضاد ورواسب العينة) في انتشار العينة فوق الشبكة في حالة العينات النظيفة نسبياً من أي رواسب (مثل العينة من مزرعة الخلية)، ومن ثم قد تحدث الصعوبة المصاحبة لنشر العينة فوق الشبكة. إضافة بروتين بنسبة قليلة (مثل ٠,١٪ زلال مصل العجول) إلى المخفف قد تساعد في حل هذه المشكلة. يمكن أن تخلط العينة مع الصبغة بالسحب بواسطة الماصة أعلى وأسفل. ضع قطرة من العينة المصبوغة على شبكة مغلفة بالكربون. بعد ١ — ٣ دقائق، تطبع قطرة من الشبكة باستعمال ورق بيبيلوس عند حافة الشبكة.

٧) رؤية العينة عند ٧٥ — ٨٠ KV عند تكبير من ٣٠٠٠٠ — ٦٠٠٠٠ مرة: تجمعات الفيروس عادة بها خمسة إلى ألف جزيء فيروس. لوصف فيروسات روتا المشاهدة بالمجهر المناعي انظر Devitt and Reynolds (6) و Theil *et al.* (20) و Saif *et al.* (18).

التحليل الكهر   هلام بو   أكريلاميد للحمض النووي الريبوزي لفـ وس روتا الطيور

Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Avian Rotavirus RNA

يمكن وضع فيروسات روتا الطيور في مجاميع على أساس الاختبارات المناعية مثل التألق المناعي والمجهر الإلكتروني المناعي (انظر سابقاً) والتصنيف بالتحليل الكهربي. بسبب وجود مجين فيروسات روتا الذي يتكون من

١١ قطعة، فإن استخلاص آر إن إيه الفيروسي والتحليل الكهربي على هلام بولي أكريلاميد يظهر شكل الحلقات ويرجع إلى أنه نمط تحليل كهربي خاص بالفيروس (انظر أسفل). المجاميع المختلفة لفيروسات روتا الطيور لها أنماط تحليل كهربي مميزة (أشكال الحلقات). لوحظت فروقات طفيفة لفيروسات روتا خلال المجموعة الواحدة. لا يكتشف الاختلاف عامة بالاختبارات المصلية لكن يكتشف بواسطة التحليل الكهربي. تستخدم الطرق التالية:

١) تجهيز الفيروس: قد تعتمد عملية القدرة على تمييز حلقات مرئية في الهلام النهائي على كمية مواد الخلفية الموجودة في تجهيز الفيروس. بالرغم من أن الطرق الموجودة تساعد في تركيز وتنقية الحمض النووي الريبوزي للفيروس فإنها تعتمد على الوضع وتنقية الفيروس قبل الاستخلاص لتقليل الخلفية غير المرغوبة. يمكن أن تجهز العينات المعوية كما وصف سابقاً (جمع العينات). يمكن أن يستعمل الراشح الناتج أو ينقى أكثر بالاستخلاص بالفلوركاربون الذي يمكن أن يتم بواسطة خلط العينة مع تراي كلورو تراي فلورو إيثان البارد عند ٤ °م (فريون) ويطحن بخلاط عالي السرعة لمدة ٢ -٣ دقائق. الخليط الناتج يمكن أن يطرد مركزياً عند ٣٠٠ — ٥٠٠ إكس جي لفصل الأشكال العضوية من المرحلة السائلة (الطبقة العليا) والتي تحتوي على الفيروس. يمكن التنقية أكثر بتقنيات الطرد المركزي مثل تعبئة الفيروس خلال طبقة من السكروز.

٢) استخلاص الحمض الريبوزي: بتعليق الفيروس المجهز في محلول اختزالي (٢٪ دوديسيل سلفات الصوديوم، و٢٠٪ جلسرول، و٤٪ ميركابتو إيثانول، و٣٠٪ يوريا في محلول تريس-جليسين). يمكن إجراء الطرد المركزي وتحتجز السوائل الرائقة. يضاف الفينول-كلوروفورم (٣:٢) إلى الرائق ويخلط ثم يطرد مركزياً مثل السابق. تحتوي طبقة القمة الحمض الريبوزي المستخلص ويمكن أن يستخدم في التحليل الكهربي. قد تشمل التقنيات الإضافية للتقنية الترسيب بالكحول الإيثيلي البارد وكروماتوجرافي السليلوز CF11 (انظر Theil (19)، و Theil *et al.* (21)).

٣) التحليل الكهربي للحمض الريبوزي: تعتمد كمية العينة المطلوبة والظروف التي يمكن أن تستعمل أثناء التحليل الكهربي بشدة على طريقة ونوع الجهاز المستخدم. اُستخدم الهلام المختلف (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.) بنجاح. يتطلب عامة الهلام القياسي الحجم التقليدي باستخدام جهاز الهلام الرأسي ٢٠ مل من العينة بينما يتطلب نظام فاست ٢ مل. يتم الفصل لمدة ٤ — ٥ ساعات عند ٤٠ مللي أمبير باستخدام ٧,٥ هلام عديد الأكريلاميد. يمكن أن يفصل هلام فاست عند ١٢ مللي أمبير بما يوازي ١٧٥ فولت-ساعة (حوالي ساعة) باستخدام ١٠٪ - ١٥٪ هلام عديد الأكريلاميد المتدرج. هذان الطريقتان هما النقيضان بين التقنيات الأكبر/الأبطأ والأصغر/الأسرع التي تعطي نتائج معقولة.

٤) صباغة الهلام: الطريقة الأكثر شيوعاً للفيروسات مزدوجة الشريط هي طريقة صبغة الفضة. لمعلومات أكثر انظر Theil (19) و Theil *et al.* (21) وتقنية تطور نظام فاست الملف رقم ٢١٠ المتوافر من فارماسيا Pharmacia.

فيروسات ريو Reoviruses

هي فيروسات ذات حمض ريبوزي مزدوجة الشريط ولها مجين به ١٠ قطع. لمعلومات إضافية شاملاً تباين العترة انظر الفصل الثامن والثلاثون.

الفيروسات المعوية الصغيرة Small Enteric Virus

هي الفيروسات التي قطرها ٣٥ نانوميتراً أو أقل وتشمل الفيروسات النجمية والفيروسات المعوية وفيروسات بارفو وفيروسات بيكوآر إن إيه الكاذبة. تم التقسيم والتسمية التالية لهذه الفيروسات على أساس حجم جزيء الفيروس والشكل كما تحدد بواسطة دراسات المجهر الإلكتروني.

الفيروسات النجمية تقريباً حوالي ٣٠ نانوميتراً. نسبة صغيرة من الجزيء يظهر شكلاً نجمياً له خمس نقاط أو ستة نقاط عند مشاهدته بالمجهر الإلكتروني. الفيروسات المعوية أيضاً حوالي ٣٠ نانوميتراً لكنها دائرية وخالية من أي أشكال سطحية. للمزيد عن هذه الفيروسات انظر Saif *et al.* (18)، و Guy *et al.* (11)، و McNulty *et al.* (13). لأن نسبة صغيرة من الفيروسات النجمية تظهر الشكل النجمي وفيروسات آسترو والمعوية تقريباً لها نفس الحجم، فإنه من الصعب إذا لم يكن مستحيلاً التعرف بدقة عليها بدون مساعدة المجهر الإلكتروني المناعي (انظر أعلى).

فيروسات بارفو حوالى ١٥ — ٢٠ نانوميتراً ويمكن أن تشاهد بالمجهر الإلكتروني من الاحتوائيات داخل الأنوية للخلايا الطلائية الماصة المعوية عندما تجهز بطريقة القطاع فائق النحافة.

حتى هذا التاريخ، لم تجرى تقارير تدل على التفريق بين المعزولات لنفس الفيروس.

الكشف المصلي في العائل Serologic Detection in the Host

فيروسات كورونا Coronaviruses

تعادل الفيروس Virus Neutralization

يجرى اختبار تعادل الفيروس كالتالي:

١) تجهيز الفيروس: يحصل على الفيروس المطلوب لهذا الاختبار من المتجانس المعوي لأجنة بيض الدجاج المحقونة (انظر أعلى). معيار الفيروس من هذا المصدر عادة يكون ٥ لو.١ متوسط جرعة معدية للدواجن لكل ملليتر (PID_{50}/ml).

٢) تستخدم طيور صغيرة قابلة للإصابة بالفيروس.

٣) لاختبار المصل يخلط مع الفيروس المخفف ويعطى للطيور. عادة تحتوي عينات المصل المجمعة من الطيور الناقهة معاملات تعادل ٢ — ٣ لو.١ PID_{50}، بينما تحتوي عينات الأمصال من طيور قابلة للإصابة على ٠ — ١ لو.١ PID_{50}.

اختبار التألق ا ناعي غ ا باشر Indirect Fluorescent Antibody Test

يمكن أن تستخدم لاكتشاف الأجسام المضادة للفيروس التاجي. يمكن أن تجهز الشريحة من الأمعاء الجنينية لأجنة البيض المحقونة بالفيروس التاجي بجمع من ٢٤ — ٤٨ ساعة بعد الحقن. تجمد الأنسجة الجنينية بسرعة وتقطع وتحفظ عند —٧٠° م حتى تستخدم. لمعلومات إضافية على كيفية إجراء تقنيات الجسم المضاد المباشرة وغير المباشرة انظر Gardner (8).

منع تلازن الدم Hemagglutination Inhibition (HI)

يمكن أن يستخدم أيضاً لكشف الأجسام المضادة للفيروسات التاجية للرومي. وصف هذه الطريقة قد يوجد في الفصل السادس والأربعون. يلاحظ التالي :

١) يجب أن يتميز المصل محل الاختبار مع الكاولين ويخلط مع كرات الدم الحمراء لتقليل التلازن غير النوعي. يمكن أن تجرى معالجة المصل بالكاولين بتحضير تخفيف ١ : ٥ من المصل مع محلول ملح فوسفات معقم. يضاف لهذا التحضير حجم مساوي من ٢٥٪ معلق كاولين (سيجما) في محلول الملح. يجب أن يخلط المجهز جيداً ويحضن عند درجة الغرفة لنصف ساعة مع الرج على فترات. عقب التحضين يطرد مركزياً عند ٥٠٠ إكس جي لنصف ساعة ويستخدم الرائق الناتج (المصل) (لاحظ أن التخفيف النهائي للمصل هو ١ : ١٠). يمكن أن تضاف عند ذلك كرات الدم الحمراء إلى المصل المتميز مع الكاولين بطريقة مماثلة.

٢) أنتيجين الفيروس يجب أن ينقى أولاً ويركز (انظر Dea *et al.* [4]) ويخفف ليعطي أربعة وحدات تلازن الدم.

٣) المستويات المكتشفة للأجسام المضادة المصلية عادة تحدث بعد الإصابة بأسبوعين.

ف وسات روتا Rotaviruses

يمكن أن تكتشف الأجسام المضادة لفيروسات روتا الطيري عقب الإصابة. تكون الطيور عامة أجسام مضادة بعد العدوى بحوالى أسبوع إلى أسبوعين . يمكن أن تجهز المجموعة A من فيروس روتا بالتمرير في مزرعة الخلية (انظر أعلى) وتنقى أكثر بتقنيات الطرد المركزي فائق السرعة باستخدام كلوريد السيزيوم. من سوء الحظ فيروسات روتا المجموعة D (الأكثر أهمية) لا تنمو بسهولة خارج الجسم. تحضير الأنتيجين لمجموعة D (الأكثر أهمية) لا تنمو بسهولة خارج الجسم. يجب تحضير الأنتيجين لمجموعة D لفيروس روتا بالحقن في طيور قابلة للإصابة. لمعلومات إضافية انظر Devitt and Reynolds (6). تعطل عدم قابلية المجموعة D لفيروس روتا على التكاثرالجهود لاستخدام الاختبارات المصلية للتشخيص التقليدي. تشمل الاختبارات التي استخدمت بنجاح لكشف الأجسام المضادة لفيروسات روتا المجهر الإلكتروني المناعي والإليزا والانتشار المناعي في الآجار وتعادل الفيروس (مجموعة A من فيروسات روتا فقط).

ا هر الإلكترو ا ناعي Immune Electron Microscopy

وصف سابقاً. يمكن أن تقيم مضادات الأمصال المجهولة لوجود الجسم المضاد بتحضين المصل المخفف (ابتداءً بتخفيف ١ : ١٠ في محلول ملح وبعد ذلك تخفيف ثنائي) مع عينات معلومة تحتوى فيروس روتا. استعمال عينات عالية التنقية للفيروس (مثال، من الطرد المركزي فائق السرعة الإيزوبيكينك) يكون منفصلاً لكن ليس ضرورياً.

الإليزا Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

المرحلة الصلبة للإليزا التي تستخدم أفيدين بيوتين كما وصف سابقاً لميكوبلازما الطيور (2) يمكن أن تستخدم لفيروسات روتا. باختصار تنقط التجهيزات المنقاه لمجموعة A و D من فيروس روتا على أقراص نيتروسيليلوز في طبق مزرعة خلية مسطح القاع وبه ٩٦ حفرة. يجب أن ينقط الأنتيجين (فيروس روتا) بالزيادة. يمكن أن يتم ذلك باستخدام ١ ميكروليتر/نقطة من الفيروس عند تركيز ١٠٠ — ٢٠٠ ميكروجرام/مل من البروتين (كما هو محدد بواسطة .Bio Rad® Protein Assay, Hercules, Calif). لاحظ أن أكثر من أنتيجين واحد (مثل مجموعة A ومجموعة D لفيروسات روتا) يمكن أن تنقط على كل قرص نيتروسيليلوز إذا أُعطي الانتباه لموقع التنقيط. عقب خطوة الإغلاق لمدة ساعة باستخدام ١٠٠ ميكروليتر/حفرة من حليب بودرة ٣٪ (وزن/حجم) في ماء مقطر، يضاف المصل المختبر. يجب أن يخفف المصل المختبر عبر الطبق في تخفيفات ثنائية ابتداءً من تخفيف ١ : ١٠٠ لتعطي ١٠٠ ميكروليتر/حفرة من المصل المخفف. يحضن المصل لمدة ساعة عند درجة الغرفة. يغسل الطبق بعد ذلك ثلاث مرات بمحلول الملح-تريس (TBS) مع ٠,٥٪ توين ٢٠ (سيجما) وتغلق المواضع غير النوعية كما سبق ويضاف الجسم المضاد الثانوي (مضاد جلوبيولين G للدجاج المقترن مع البيوتين [IgG]، معامل فيكتور بيرلنجام، كاليفورنيا) عند تخفيف ١ : ٢٠٠٠ في محلول ملح-تريس بمعدل ١٠٠ ميكروليتر/حفرة ثم يحضن لمدة ساعة عند درجة الغرفة. لاحظ أن الجلوبيولين المناعي المقترن مع البيوتين متساوي الفعالية لاختبار أمصال الرومي. عقب التحضين مع الجسم المضاد الثانوي يغسل الطبق وتقفل المواضع غير النوعية blocking كما سبق ويضاف إنزيم بيرأوكسيداز هورس رادش المقترن مع أفيدين D عند تخفيف ١ : ٢٠٠٠ في محلول ملح-تريس بمعدل ١٠٠ ميكروليتر/حفرة. يحضن الطبق لمدة ٢٠ — ٣٠ دقيقة عند درجة الغرفة ويغسل ويضاف ١٠٠ ميكروليتر/حفرة من محلول الإظهار الذي يتكون من إضافة ٦ ميكروليتر من ٣٠٪ فوق أكسيد الهيدروجين إلى ١٠ مل من محلول ملح-تريس وعند ذلك يضاف ٢ مل من المحلول المركز A (المحلول المركز A : ١٠٠ مل كحول ميثيلي + ٣٠٠ مجم من ٤-كلورو-١-نافثول [سيجما] ويحفظ في وعاء واقي من الضوء ويستبعد إذا ظهر لونه أصفر). يجب أن يستخدم محلول إظهار اللون فوراً. يظهر لون الطبق في الظلام لمدة ٥ — ١٥ دقيقة. االلون الأزرق/الوردي الداكن على خلفية بيضاء يدل على نتيجة إيجابية، بعد تطوير اللون يشفط محلول إظهار اللون ويضاف ماء مقطر معقم لإيقاف التفاعل. اترك

الطبق ليجف (ساعات قليلة) قبل القراءة. يمكن أن تقرأ الأطباق عند الطول الزراعي تحت ضوء الغرفة المتألق. يمكن أن تحفظ الأطباق المكونة للون لفترات طويلة من الوقت إذا حفظت من الضوء، والأطباق/الحفر التي لم تتفاعل إيجابياً يمكن أن يعاد استخدامها عند الحاجة.

اختبار الانتشار ا ناعي الآجار Agar-gel Immunodiffusion

يمكن أن يستخدم لاختبار الأمصال للأجسام المضادة لفيروس روتا. الطريقة المستخدمة وصفت سابقاً بواسطة Devitt and Reynolds (6). باختصار، تغطي شريحة مجهر نظيفة مقاسها ٢,٥ x ٧,٥ بكمية ٥ مل من آجار نوبل ١٪ (معامل دفكو) مضبوط لدرجة بي إتش ٨,٥ ويحتوى على ٨,٥٪ كلوريد صوديوم، و١٪ بولي إيثيلين جليكول، و٠,٥٪ آزيد الصوديوم. تبرد الشرائح عند ٤ °م لمدة ١٢ ساعة وتقطع الحفر باستخدام القالب القياسي. يوضع الفيروس المنقى في الحفرة المركزية (٢٥ - ٣٥ ميكروليتراً بمعدل ٢٠٠ – ٥٠٠ ميكروجرام/مل من البروتين) ويصنع التخفيف الثنائي للمصل في محلول ملح (٢٥ – ٣٥ ميكروليتراً/حفرة) ويوضع في الحفر الطرفية ثم تحضن الشرائح لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة عند درجة الغرفة في غرفة رطبة. يمكن أن تقرأ خطوط الترسيب باستخدام الضوء المائل.

تعادل الف وس Virus Neutralization

يمكن أن يستخدم لتحديد الأجسام المضادة لمجموعة A من فيروسات روتا لأن المجاميع الأخرى لا تنمو بسهولة في أنظمة مزرعة الخلية. تستخدم خلايا MA104 (انظر أعلى) لتنمية مجموعة A لفيروسات روتا وتنمى لحد أدنى ٨٥٪ اندماج في أطباق مزرعة الخلية مسطحة القاع لها ٩٦ حفرة. الطريقة المستخدمة هي فيروس ثابت مع تخفيف المصل. تم تمرير مجموعة A من فيروسات روتا سابقاً في خلايا MA104 واُستخدمت عند تركيز نهائي $١٠^{٢}$ متوسط جرعة معدية لمزرعة الخلية ($TCID_{50}$). يجب أن ينشط الفيروس أولاً بواسطة التربسين لمدة ساعة عند ٣٧ °م مع ١٠ ميكروجرام/مل من نوع IX تربسين (انظر أعلى) وعقب ذلك يخلط الفيروس مع تخفيفات المصل المقابلة. تبدأ التخفيفات الثنائية المتسلسلة بتخفيفات ١ : ١٠. عند ذلك يضاف مخلوط الفيروس والمصل إلى الخلايا المغسولة في الطبق بمعدل ١٠٠ ميكروليتر/حفرة ويحضن لمدة ٩٠ دقيقة عند ٣٧ °م للسماح للفيروس بالامتزاز وبعد ذلك تغسل الحفر (الخلايا) مرتين بالأوساط الخالية من المصل (انظر سابقاً) وتضاف أوساط الحفظ الخالية من المصل بمعدل ١٠٠ ميكروليتر/حفرة وتحضن الأطباق لمدة ٤٨ ساعة. يمكن أن يقرأ الطبق باستخدام المجهر المقلوب ويفحص لوجود التأثير المرضي الخلوي.

الف وسات ا عوية الصغ ة Small Enteric Viruses

لا توجد اختبارات مصلية لتحديد الإصابة في العائل.

ف وسات ريو Reoviruses

للتعرف المصلي في العائل ارجع للفصل الثامن والثلاثون عن التهاب المفاصل الفيروسي والتهاب غمد الوتر وإصابات الربو الفيروسية الأخرى.

التفريق من العوامل ا مرضة ا شا ة Differentiation from Closely Related Agents

الفيروسات المعوية المختلفة كما وصفت سابقاً يمكن أن يفرق بعضها عن بعض باستخدام التقنيات المميزة الموصوفة سابقاً. إضافة إلى ذلك فإن العوامل غير الفيروسية الأخرى يجب أن تؤخذ في الاعتبار أيضاً عند محاولة تشخيص الأمراض المعوية في الطيور الصغيرة. يجب أن يؤخذ في الاعتبار كلاً من العوامل المعدية وغير المعدية. أمثلة للعوامل المعدية تشمل العوامل الطفيلية وحيدة الخلية (الأولية) (مثل أيميريا وكربتوسبوريديا وهيكساميتا)، والعوامل البكتيرية (مثل أنواع السالمونيلا). أمثلة للعوامل غير المعدية قد تشمل السموم ونقص الغذاء والزيادات. المرض المعوي هو مرض مركب وقد يكون له مسببات مركبة ومن ثم قد تدخل في هذا الأمر عوامل عديدة (كلاً من الفيروسية وغير الفيروسية).

ا راجع References

1. Ali, A., and D. Reynolds. Stunting syndrome in turkey poults: further characterization of the etiologic agent. In: Proceedings of the North Central Avian Disease Conference, Minneapolis, Minn., Sept. 17-19. p. 109. 1995.
2. Cummins, D. R., D. L. Reynolds, and K. R. Rhoades. An avidin-biotin enhanced dot-immunobinding assay for the detection of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae serum antibodies in chickens. Avian Dis. 34:36-43. 1990.
3. Dea, S., S. Garzon, and P. Tijssen. Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (bluecomb) coronavirus in a continuous human rectal adenocarcinoma cell line. Am. J. Vet. Res. 50:1310-1318. 1989.
4. Dea, S., G. Marsolais, J. Beaubien, and R. Ruppanner. Coronaviruses associated with outbreaks of transmissible enteriris of turkey in Quebec: hemagglutination properties and cell cultivation. Avian Dis. 30:319-326. 1986.
5. Dea, S., and P. Tijssen. Detection of turkey enteric coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay and differentiation from other corpnaviruses. Am. J. Vet. Res. 50:226-231. 1989.
6. Devitt, C. M., and D. L. Reynolds. Characterization of a group D rotavirus. Avian Dis. 37:749-755. 1993.
7. Dziuk, H. E., O. A. Evanson, and C. T. Larson. Physiologic effects of fasting and bluecomb in turkeys. Am. J. Vet. Res. 30:1045-1056. 1969.
8. Gardner, P. S. Immunofluorescence. In: Clinical virology manual. S. Specter and G. J. Lancz eds. Elsevier Science Publishing Co., New York, N.Y. pp. 95-109. 1986.
9. Guy, J. S., and H. J. Barnes. Partial characterization of a turkey enterovirus-like virus. Avian Dis. 35:197-203. 1991.

10. Guy, J. S., and H. J. Barnes. Poult enteritis and mortality syndrome ("spiking mortality"): an acute, transmissible disease of unknown origin. Presented at the 1996 Enteric Disease Control Symposium, AAAP/AVMA annual meeting, Louisville, Kentucky, July 20, 1996.
11. Guy, J. S., H. J. Barnes, L. G. Smith, and J. Breslin. Characterization of coronaviruses identified in turkeys with poult enteritis and mortality syndrome. Abstract. In: Proceedings of the 46th Western Disease Poultry Disease Conference. Sacremento, Calif., March 1-4, 1997. p. 42.
12. McNulty, M. S. Rotavirus infections. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 692-699. 1997.
13. McNulty, M. S., W. L. Curran, D. Todd, and J. B . McFerran. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. Avian Pathol. 8:239-247. 1979.
14. Pomeroy, B. S., and K. V. Nagaraja. Coronaviral enteric infections of turkeys (bluecomb disease). In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 686-692. 1997.
15. Reynolds, D. L. Enteric virus infections of young poultry. Poult. Sci. Rev. 4:197-212. 1992.
16. Reynolds, D. L. Astrovirus infections. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H.J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 701-705. 1997.
17. Reynolds, D.L. Enteric disease complex. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 1016-1018. 1997.
18. Saif, L. J., Y. M. Saif and K. W. Theil. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. Avian Dis. 29:798-811. 1985.
19. Theil, K. W. A modified genome electropherotyping procedure for detecting turkey rotaviruses in small volumes of intestinal contents. Avian Dis. 31:899-903. 1987.
20. Theil, K. W., D. L. Reynolds and Y. M. Salt. Isolation and serial propagation of turkey rotaviruses in a fetal rhesus monkey kidney (MAI04) cell line. Avian Dis. 30:93-104. 1986.
21. Theil, K. W., D. L. Reynolds, and Y. M. Salt. Genomic variation among avian rotavirus-like viruses detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Avian Dis. 30:829-834. 1986.

الفيروسات السرطانية: ليكوسيس/ساركوما (تكثر نسيج البيض) وريتيكلوإندوثيليوسيس (شباك بطائي)

ONCORNA VIRUSES: LEUKOSIS/SARCOMAS AND RETICULOENDOTHELIOSIS

علي م. فضلي، وريتشارد ل. ويتر
Aly M. Fadly and Richard L. Witter

الملخص Summary

فيروس ليكوسيس الطيور (ALV) وفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس (REV) هي أكبر فيروسات سرطانات الطيور الشائعة الموجودة طبيعياً والمرتبطة مع ظروف المرض السرطاني في الدواجن. يصيب فيروس ليكوسيس أساساً الدجاج، بينما يصيب فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس الدجاج والرومي والبط والفزان والسمان والعديد من أنواع الطيور الأخرى. بالإضافة إلى الأورام التي تحدث، فإن كلاً من الفيروسين يستطيع أن يقلل الإنتاجية ويحدث تثبيطاً مناعياً ومشاكل إنتاج أخرى في القطعان المصابة. اختبارات الفيروس أو الجسم المضاد غير عملية للمساعدة في التشخيص التفريقي للأمراض السرطانية نتيجة الفيروس في الدواجن لأن فيروسات الطيور السرطانية واسعة الانتشار والإصابة في غياب تكوين الورم تكون شائعة. اُستخدمت التقنية الحالية المبنية على التهجين الجزيئي أو الكيمياء الخلوية المناعية مع الأجسام المضادة أحادية الصفة للأنتيجينات الخلوية والسرطانية النوعية لتطوير طرق أكثر حساسية ونوعية للتشخيص المقارن للأورام المسببة بفيروسات الطيور. لا تتوافر اللقاحات التي تقي الدجاج والرومي من الإصابة بفيروس ليكوسيس وريتيكلوإندوثيليوسيس تجارياً.

تعريف المسبب Agent Identification

يفضل عمل التشخيص بعزل الفيروس في مزرعة الخلية، وإظهار أنتيجين المجموعة النوعي في زلال البيض بالإليزا، والتأكد أنها فيروسات سرطانية بالاختبارات مثل تعادل الفيروس والتألق المناعي. تكون هذه الاختبارات للفيروس أو الأنتيجين مفيدة جداً في تعريف وتقسيم المعزولات الجديدة، وترصد القطعان الخالية من المرض

وقطعان الأمهات الأخرى لخلوها من الإصابة بالفيروس، واستدراك الإصابة بفيروس، واستبعاد الأخرى وفي اختبارات الأمان للقاحات.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

اختبار تعادل الفيروس هو الأكثر حساسية لتحديد الجسم المضاد لفيروس ليكوسيس الطيور وفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس ويمكن أيضاً استخدام اختبار أطقم الإليزا التجارية لتوضيح الجسم المضاد للنوعين. يمكن أن يستخدم اختبار الترسيب في الآجار لكشف الجسم المضاد لفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس لكنه ليس على درجة حساسية الإليزا والتألق المناعي.

ا قدمة Introduction

أطلق سابقاً على الليكوسيس الليمفاوي (LL) مرض الكبد الكبير أو السرطان الليمفاوي الحشوي ويسببه فيروس ليكوسيس الطيور وهو مرض شائع الحدوث في الدجاج ويتسبب بواسطة فيروسات الطيور السرطانية المجموعة ليكوسيس/ساركوما. حديثاً وجد نمط جديد (J) يرتبط مع الحدوث العالي نسبياً للسرطان الخلوي للخلايا النخاعية (myelocytomatosis) في الدجاج اللاحم (26). ينتقل سرطان الطيور الليمفاوي تناسلياً أو بالتلامس المباشر ويحدث في جميع أنحاء العالم في كل قطعان الدجاج على الأغلب. يمكن لعوامل الإجهاد أو التثبيط المناعي أن تزيد قابلية الدجاج للإصابة بالفيروس وإفرازه. يضم ريتيكلوإندوثيليوسيس مجموعة من المتلازمات المرضية التي يسببها فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس من فيروسات الطيور المسببة للسرطان. أكثر الأمراض الإكلينيكية شيوعاً هو الورم الليمفاوي المزمن والتقزم، إلا أن سرطان الخلية الشبكية الحاد يمكن أن يحدث بواسطة العترة المعملية (عترة T) التي هي خليط من الفيروس السرطاني المحتوي على الفيروس المفتقر للتناسخ والفيروس المساعد غير الناقص nondefective helper virus و oncogene-containing replication-defective virus (43). ينتقل الفيروس رأسياً وأفقياً، وبحقن المواد البيولوجية الملوثة، يتوافر بحوث مرجعية شاملة على مجموعات ليكوسيس ساركوما وريتيكلوإندوثيليوسيس الطيور (27 ,46).

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

بالإضافة إلى الليكوسيس الليمفاوي وساركوما تحدث فيروسات ليكوسيس ساركوما مدى واسعاً من الحالات السرطانية مثل السرطان العظمى، وسرطان خلايا الدم الحمراء، وسرطان الأعضاء الدموية، وسرطانات الكلى، وسرطان الخلايا النخاعية بنوعيها. يتأثر نوع الورم بعترة الفيروس وجرعة التعرض والنوع الجيني للعائل

وطريقة العدوى والجنس والعمر عند التعرض (27). ينشأ السرطان الليمفاوي (LL) أو السرطان الليمفاوي لخلايا B في الدجاج في بصيلات بيرسا فايريسي مع خلايا ليمفاوية بيرسا متحورة منتشرة إلى الكبد والطحال والأعضاء الحشوية الأخرى (15). لأن فترة الحضانة طويلة نسبياً (نادراً أقل من ١٤ أسبوعاً)، يحدث مرض الليكوسيس الليمفاوي في الأمهات وقطعان إنتاج البيض، لكن ليس في الدجاج اللاحم. الأعراض المرضية لليكوسيس الليمفاوي غير نوعية (27). يمكن اكتشاف تضخم البورصة والكبد بالجس في الحالات المتقدمة. تشريحياً، وجود عقد ليمفاوية متضخمة في البيرسا يعتبر مميزاً لليكوسيس الليمفاوي، وقد تكون الآفات في الكبد والأعضاء الحشوية الأخرى شائعة أو عقدية. مجهرياً، يتميز الليكوسيس الليمفاوي بالتخلل داخل بصيلات البيرسا مع الخلايا السرطانية (27). وجد أن لقاح مرض مارك المحتوي على النوع المصلي ٢ لفيروس هيربس مرض مارك (5) يحفز تطور الليكوسيس الليمفاوي في خطوط معينة من الدجاج عقب التعرض لفيروس ليكوسيس الطيور بعد الفقس (3 ,18). نادراً ما تظهر العدوى الطبيعية بفيروس ريتكلواندوثيليوسيس إكلينيكياً في الدواجن. يحدث نفوق في الرومي عند عمر ١٢ إلى ٢٠ أسبوعاً. الأورام الليمفاوية تظهر في الكبد والأمعاء والقلب وبقية الأحشاء الأخرى، ويحدث تضخم في الأعصاب (46). الخلايا السرطانية تكون كبيرة ومتماثلة ولكن لا يظهر ذلك في النسل. في الدواجن التي تم إعدائها بالفيروس عند الفقس، يمكن لمرض التقزم أن يحدث خلال ٢ - ٣ أسابيع. هذا المرض يتميز بتأخر في النمو وتشوه في ظهور الريش (19).

تجريبياً وجد أن إعداء الدواجن بفيروس ريتكلواندوثيليوسيس يسبب نوعين من الأورام الليمفاوية: ورم ليمفاوي بيرسا لخلايا بي B-cell، وورم ليمفاوي لا بيرسا لخلايا تي T-cell (46). وتختلف الاستجابة على حسب سلالة الفيروس والجرعة وطريقة التعرض ونوع الطائر. بسبب أن الأضرار عادة لا تكون مميزة لمرض معين، فإن تشخيص المرض إكلينيكياً يجب أن يعتمد على كل من الخصائص المرضية وتأكيد العدوى مصلياً وفيروسياً. لقاحات المصل ٢ MD وجد أيضاً أنها تزيد من تطور فيروس ريتكلواندوثيليوسيس المسبب للورم الليمفاوي لخلايا B ولكن لا يسبب ذلك لخلايا T.

ع العينات Sample Collection

ليكوسيس الطيور Avian Leukosis

لأنه واسع الانتشار بين الدجاج، فإن عزل الفيروس وإظهار الأنتيجين أو الجسم المضاد له قيمة محدودة أو ليس له قيمة في تشخيص الحالات الحقلية لليكوسيس الليمفاوي، إلا أن الاختبار للفيروس أو الأنتيجين أو الجسم المضاد يكون مساعد البرامج لخفض أو التخلص من الإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور. يجب أن تجمع المواد والخامات والفيروس والأنتيجين والمصل المضاد وتوضع على ثلج ذائب أو تحفظ عند −٧٠ °م حتى تُختبر. عادة

تجمع العينات في المحلول المنظم المستخدم في الاختبار المقرر وتخزن في –٢٠ °م. تجمع العينات للاختبار بالإليزا في محلول ملح فوسفات يحتوي على ٠,١٪ توين ٨٠، بينما العينات المراد فحصها باختبار تثبيت المتمم تجمع في محلول باربيتال أو فيرونال.

الدم الكامل، البلازما أو ا صل Whole Blood, Plasma, or Serum

الدم الكامل والبلازما هي الأكثر استخداماً لعزل الفيروس. يجمع الدم بمحقن يحتوي على ٥٠ وحدة من الهيبارين الخالي من المواد الحافظة/مل. قد يتداخل الهيبارين مع تكاثر فيروسات ليكوسيس الطيور من غير النمط تحت المجموعة A. قد تستخدم مضادات التجلط الأخرى [مثل ١٠٪ (حجم/حجم) من ٣,٥٪ محلول سترات الصوديوم]، أو الدم لجمع المصل يمكن أن يجمع في أنابيب تحتوى ٠,١ – ٠,٢ مل من ٢٥٪ مستخلص أجنة دجاج مثبط حرارياً (من أجنة معروف خلوها من فيروس ليكوسيس الطيور) لتحفيز التجلط. يجب أن يوضع الدم على ثلج ذائب بسرعة بعد التجلط. يرسل الدم الكامل سريعاً بعد جمعه على عبوات ثلجية ولا يجب أن يجمد. عينات البلازما أو المصل للعزل الفيروسي يجب أن ترسل على ثلج جاف. لتجنب التداخل بالأجسام المضادة المعادلة، يفضل عزل فيروس ليكوسيس الطيور من عينات حديثة من خلايا الدم البيضاء أو الدم الكامل. إذا كان هناك ضرورة للتأخير، يجب أن يضاف وسط مزرعة نسيج يحتوي على ١٠٪ داي ميثيل سلفوكسيد و١٥٪ مصل أبقار إلى العينة وعندئذ يجب أن تجمد العينة ببطء وتحفظ عند -١٩٦ °م. عينات البلازما والمصل غير مناسبة لاكتشاف فيروسات ليكوسيس الطيور الخارجية (exogenous ALV) بالاختبار للأنتيجين كأنتيجين داخلي محدد للمجموعة (endogenous) لأنه قد يؤدي إلى نتائج إيجابية وهمية (28).

ا سحات ا خاطية وا معية أو ا هبلية
Meconium and Cloacal or Vaginal Swabs

المخاط من صوص دجاج عمر يوم أو المسحات من المجمع أو المهبل من الدجاج الكبير يمكن أن تستخدم لعزل الفيروس أو لاكتشاف الأنتيجين المحدد للمجموعة (27). تؤخذ عينات المجمع بدوران مسحات القطن المعقمة خمس مرات في المجمع. يجب عدم السماح للمادة البرازية الزائدة لتلتصق بالمسحات. تؤخذ المسحات المهبلية عن طريق قلب المجمع كما في التلقيح الصناعي ولا تستخدم لاختبار الدجاجات التي ليست في مرحلة إنتاج البيض لأن المجمع في مثل هذا الدجاج لا ينقلب بسهولة. لعزل الفيروس توضع المسحات في أنبوبة تحتوي على وسط مزرعة نسيج مزود بـ ١٠٠٠ وحدة من البنسللين G، وسلفات ستربتوميسين، و١٠٠ ميكروجرام من جنتاميسين، و٥ ميكروجرامات امفوترسين B لكل ملليتر. يجمع المخاط للعزل بوضع أنبوبة تحتوي السائل السابق وصفه (١ مل)

عند فتحة المجمع ويضغط على البطن بخفة. قبل الاختبار تزال المواد الصلبة من عينات المخاط بالطرد المركزي عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق.

الزلال Albumen

يمكن أن يستخدم لكشف الفيروس أو الأنتيجين المحدد للمجموعة (40) وهو الأكثر حساسية ووسيلة عملية للتعرف على الدجاجات التي تنقل فيروس ليكوسيس الطيور خلقياً. يمكن سحب العينات من الزلال الخفيف بمحقن أو ماصة باستير خلال ثقب في النهاية الصغيرة لبيض غير محضن. لاختبارات الفيروس يجب جمع الزلال من البيض خلال ٤٨ ساعة من وضع البيض. في معظم الحالات، يتم مسح الدجاجات لإفراز الفيروس باختبار الزلال للأنتيجين المحدد للمجموعة من اثنان أو ثلاثة بيضات موضوعة تتابعياً لكل دجاجة، إلا أنه قد يعتمد التعرف على الدجاجة المفرزة بشكل متقطع على تكرار الاختبار وعدد البيضات المختبرة لكل دجاجة.إذا كان البيض للفقس، يمكن جمع ٠,٣ مل من الزلال بطريقة معقمة ويغلق الثقب بشمع بارافين أو شريط لاصق أو أسمنت نموذجي. لتسهيل العمل بالزلال يجب أن يخفف مرتين إلى أربع مرات في محلول يُستخدم أساساً في الاختبار. يظل أنتيجين فيروس ليكوسيس الطيور ثابتاً في زلال البيض على الأقل لمدة ٦٣ يوم عند ٨ °م.

أجنة الدجاج Chickem Embryos

يرتبط عزل الفيروس من مستخلص أجنة الدجاج مع الانتقال الخلقي للفيروس، .إلا أن عينات الزلال والدم ومسحات المجمع والمهبل أسهل للتداول من الأجنة. يجهز مستخلصات الجنين بضغط أجنة عمر ٩ — ١١ يوم خلال محقن ٥ مل إلى ١ مل من محلول فوسفات. يجهز المعلق ويذاب ثلاث مرات وينقى بعد ذلك بالطرد المركزي عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ٢٠ دقيقة. يستخدم الرائق لعزل الفيروس أو لاكتشاف الأنتيجين.

الأورام والأنسجة الأخرى Tumors and Other Tissues

قد تحتوي بعض الأورام كمية كبيرة من الفيروس لكن الأخرى قد لا تحتوي على فيروس بمستوى يمكن اكتشافه. تؤخذ الأورام بطريقة معقمة ويجب أن تختبر طازجة أو مجمدة عند أو أقل من —٧٠ °م. ٥٪ - ١٠٪ من الورم المطحون في محلول ملح الفوسفات أو وسط مزرعة النسيج يمكن أن يستخدم لعزل الفيروس أو لاكتشاف الأنتيجين المحدد للمجموعة، إلا أن عزل الفيروس من الورم لا يعني بالضرورة العلاقة السببية بين الفيروس والورم، كما أن كل القطعان التجارية ومعظم الدجاج في القطيع يتعرض لفيروس ليكوسيس الدجاج. يستخدم الفحص المجهري لتشخيص وتفريق الأورام. الأنسجة الأخرى مثل العرف من الصوص حديث الفقس وأطراف الريش يمكن أن

تستخدم لكشف الأنتيجين المحدد للمجموعة، على الرغم أن اختبار هذه المواد قد قورن مع تقنيات الاختبار الأخرى فقط على مستوى ضيق (10). تجمع أطراف الريش في أنابيب تحتوي على المحلول المقرر استخدامه في الاختبار وتقطع بمكبس من التيفلون المثبت جيداً. يجب أن يعامل النسيج المقطع بالأمواج فوق الصوتية أو يجمد ويذاب ثلاثة مرات قبل الاختبار. يجمع الكبد ومعظم قناة البيض من الدجاج المقتول حديثاً وتعتبر مصادر غنية بالفيروس (27).

ريتيكلوإندوثيليوسيس Reticuloendotheliosis

العينات المفضلة للعزل من الدم والطحال وأنسجة الأورام المحتوية على خلية حية كاملة من الطيور عند أي عمر بآفات مشتبه بها. يمكن حفظ الطعم الخلوي لعدة ساعات عند ٤°م لعدة ساعات وعند −٧٠°م أو −١٩٦°م لمدة طويلة بعد التجميد البطيء في وسط مزرعة الخلية المحتوية ١٥٪ مصل أبقار و١٠٪ داي ميثيل سلفوكسايد. بالرغم من إمكانية عزل الفيروس من البلازما أو مستخلص النسيج، فإن مثل هذه العينات الخالية من الخلية أقل كفاءة بالنسبة للتجهيزات الخلوية لأن الفيروس غير ثابت نسبياً ومستوى هذه التجهيزات عادة منخفض. الدم الكامل المجموع على هيبارين أو الخلايا الليمفاوية الدموية هي عادة النسيج المفضل لعزل الفيروس.

لعزل فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس من النسيج، يجمع حوالي ١ − ٢ جم من الطحال أو الورم بشكل معقم، ويوضع في ١٠ − ٢٠ مل من وسط مزرعة الخلية، ويقطع بهدوء بمشرط أو مقص حاد، ويمرر مع التكرار خلال محقن ١٠ مل يرشح خلال طبقتين من الشاش المعقم. يطرد الراشح مركزياً ويعاد تعليق ١ حجم من الخلايا المعبأة في حوالي ٩ أحجام من وسط مزرعة الخلية.

أوساط الزرع ا فضلة وا واد ا ستخدمة Preferred Culture Media and Substrates

ليكوسيس الطيور Avian Leukosis

مزرعة ا لية Cell Culture

على عكس فيروسات ساركوما، معظم فيروسات الليكوسيس لا تظهر تغيرات مورفولوجية في المزرعة. وبالتالي الاختبارات البيولوجية غير المباشرة مثل تثبيت المتمم (كوفال COFAL) (35)، والإليزا (9)، وخلط الأنماط الشكلية phenotypic mixing (PM) (25)، والعامل المحدث للمقاومة resistance-inducing factor (RIF) (33)، وتنشيط الخلية غير المنتجة nonproducer (NP) cell activation (32) تستخدم كاختبارات لكشف فيروسات ليكوسيس الطيور. تستخدم الإليزا أكثر شيوعاً لأنها أكثر حساسية وأقل استهلاكاً للجهد عن الاختبارات الأخرى مثال كوفال وخلط الأنماط الشكلية. تتطلب هذه الاختبارات استخدام الخلايا الليفية لأجنة الدجاج مع مدى عائل نوعي (الجدول رقم ٣٤,١). اختبارات كوفال وإليزا تجرى على مرحلتين:

١) إكثار الفيروس في مزرعة الخلايا الليفية.

٢) كشف أنتيجينات فيروس ليكوسيس الطيور بالكوفال أو الإليزا.

بالإضافة لكواشف اختبار إليزا وكوفال التي تؤخذ من مصادر تجارية متعددة، كلا الاختبارين يتطلبا الكواشف النوعية التالية :

١) مزرعة خلية قابلة لفيروس ليكوسيس الطيور الداخلي والأنتيجين المحدد للمجموعة.

٢) مخزون مرجعي لأنتيجين المجموعة والذي يتم الحصول عليه من خلايا مصابة بفيروس ليكوسيس الطيور أو فيروس ساركوما.

٣) مضادات مصلية عالية التخصصية للأنتيجين المحدد للمجموعة لفيروسات ليكوسيس ساركوما المحضرة في الفئران الذهبية أو الأرانب (27)، الأجسام المضادة آحادية النسيلة ضد p27 ظهر أنها تحفز نوعية وحساسية الاختبار المستخدم لكشف الأنتيجين المحدد للمجموعة (14).

٤) مخزون معلوم لفيروسات ليكوسيس وساركوما.

بعض هذه الكواشف يمكن الحصول عليها من مصادر تجارية.

ا دول رقم (٣٤,١). الأ اط الشكلية للخلايا الليفية ـ الدجاج (CEF_s) ا ستخدمة لكشف ف وسـات ليكوسـيس الطيـور (ALV_s) ا ارجية والداخلية.

خط CEF	النمط الشكلي[A]	القابلية لأ اط ا اميع لف وسات ليكوسيس/ساركوما	
		قابل لـ	مقاوم لـ
0	C/E	A, B, C, D, J	E
15B1	C/O	A, B, C, D, J, E	-
alv_6[B]	C/A , C/E	B, C, D, J	A, E
alv_6 x $15B_1$	C/A	B, C, D, J, E	A

[A] C/E = خلايا مقاومة تحت المجموعة E من فيروسات L/S.

C/O = خلايا قابلة لكل المجاميع التحتية فيروسات L/S.

C/A = خلايا مقاومة تحت المجموعة A من فيروسات L/S.

[B] لأن alv_6 لها خلفية خط O، فإن الخلايا أيضاً مقاومة تحت المجموعة E (الداخلي) لفيروس ليوكوزيس الطيور.

ريتيكلوإندوثيليوسيس Reticuloendotheliosis

مزرعة ا لية Cell Culture

من خلال تنمية الطعم الخلوي لمدة ٩ — ١٤ يوماً في مزارع ليفية من الطيور وإظهار الأنتيجينات الفيروسية أو النسخ العكسي الإنزيمي.

معظم وربما كل العترات الحقلية من فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس يمكن تمريرها بسهولة في مزارع خلية الطيور. تستعمل المزارع الثانوية طبيعياً على الرغم أن مزارع كلى الدجاج أو الخلايا الليفية لجنين البط أو الخلايا الليفية لجنين الرومي أو الخلايا الليفية لجنين السمان يمكن أن تكون مناسبة أيضاً. لأن فيروسات ريتيكلوإندوثيليوسيس يمكن أن تنتقل رأسياً، ويجب أن تكون الأجنة من أمهات خالية من الإصابة. خط خلية QT-35 المكون من الخلايا الليفية المحورة كيميائياً من طائر السمان أيضاً قابل للإصابة (8).

للعزل الأولي تحقن المزارع غير المصروفة في الأطباق ٣٥ ملم أو ٦٠ ملم والمكونة لطبقات وحيدة منفصلة عادة خلال ٦ — ٢٤ ساعة بعد الفرد بكمية ٠,١ مل من عينة الاختبار الخلوية، ويجب أن تحقن العينات الخالية من الخلية إلى المزارع المصروفة المضاف إليها الوسط بعد الادمصاص لمدة ٣٠ دقيقة. تبقى المزارع لمدة ٧ — ٩ أيام عند ٣٨ °م مع أول تغيير للوسط بعد ٢٤ ساعة والتغيرات التالية على فترات من ٢ — ٣ أيام. يتمم التمرير الثاني بوضع السائل الرائق في مزرعة جديدة محفوظة في طبق ٣٥ ملم (٠,٥ مل لكل طبق) أو طبق ٩٦ حفرة (٠,١ مل لكل حفرة)، التي تحفظ لمدة ٥ — ٧ أيام أكثر.

تشمل الضوابط مزارع محقونة بنماذج أصلية prototype غير معيبة للفيروس مثل عترة T أو CS ومزارع غير محقونة. من الحكمة أن تستعمل عدة مزارع غير محقونة توضع عشوائياً بين مزارع الاختبار لرصد الانتشار الطارئ لفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس الذي يمكن أن يكون مشكلة إذا لم تُتَداول المزارع بحرص.

تعريف ا سبب Agent Identification

ا واص الفيزيوكيميائية Physiochemical Properties

ليكوسيس الطيور Avian Leukosis

تحتوي فيروسات ليكوسيس/ساركوما الطيور على حمض نووي ريبوزي مفرد الشريط (27). هذه الفيروسات حوالي ٦٠٪ بروتين بالوزن ويكون مكوناً للبروتين الداخلي وإنزيم النسخ العكسي وبروتينات الغلاف. يشتق حوالي ٣٥٪ من الدهون من غشاء الخلية و٤٪ يكون نشويات مصاحبة للغلاف البروتيني. الجاذبية النوعية للفيروس هي ١,١٦. هذه الفيروسات حساسة لمذيب الدهون ودرجة الأس الهيدروجيني المنخفضة وعالية المقاومة للإشعاع فوق البنفسجي (27). لأنها غير ثابتة حرارياً، فإن الحفظ طويل الأمد بدون فقد للإمراضية يكون محتملاً فقط عند أقل من —٦٠ °م. مورفولوجياً تقسم فيروسات ليكوسيس/ساركوما كجزئيات المجموعة C بقطر ٨٠ — ١٠٠ نانوميتراً. أعضاء هذه المجموعة لا يمكن تفريقها على أسس التركيب الدقيق. تحتوي فيروسات ليكوسيس/ساركوما الطيور على الإنزيم الناسخ العكسي الفريد مصلياً، ويكتشف الأنتيجين المحدد للمجموعة بواسطة تثبيت المتمم أو الإليزا. بناءً على خواص البروتينات النشوية للغلاف الفيروسي، تشمل أعضاء مجموعة

ليكوسيس/ساركوما فيروسات ليكوسيس الطيور من الدجاج ويقسم إلى خمسة أنماط A و B و C و D و E (27). بالإضافة إلى ذلك فإن فيروس ليكوسيس الطيور الخارجي المعزول من الدجاج اللاحم يتميز من فيروسات المجاميع من A حتى E ويقسم كنموذج أصلي لمجموعة جديدة (J) لفيروس ليكوسيس الطيور (26). مغايراً لفيروسات اللوكيميا الحادة لمجموعة ليكوسيس/ساركوما، فإن فيروسات ليكوسيس الطيور الخارجية (المنتمية إلى المجموعات A و B و C و D و J) وفيروسات ليكوسيس الطيور الداخلية (مجموعة E) غير معيبة وتفتقر إلى إحداث الأورام في العائل (27).

عديدات الببتيد التركيبية (p10, p12, p15, p19, p27) تشترك في كل أعضاء مجموعة ليكوسيس/ساركوما لفيروسات الطيور السرطانية التي تشمل فيروسات ليكوسيس الطيور الداخلية والخارجية، وp27 هو الأكثر كثافة. اعتمدت التقنيات لاكتشاف الإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور كثيراً على الاختبارات للفيروس أو أنتيجين الفيروس علاوة على اختبارات الجسم المضاد.

بالإضافة إلى اختبارات إليزا وتثبيت المتمم، ويمكن استعمال طرق الصبغ المناعي الخلوي الكيميائي مثل التألق المناعي أو الإنزيم المناعي المضاد لبيروكسيداز أو الذهب المحمل ببروتين A لاكتشاف الأنيتجين المحدد المجموعة المرتبط مع جزيئات فيروس ليكوسيس الطيور في قطاعات من أنسجة مختلفة (20 ,27). أيضاً تتطلب هذه الطرق استعمال الجلوبيولين المناعي G المضاد لـp27 النوعي.

اختبار إليزا المباشر أو اختبار تثبيت المتمم يمكن أن يستعمل لاكتشاف الأنتيجين المحدد للمجموعة في عينات الزلال من مسحات المجمع أو المخاط أو الدم الكامل أو بصيلات الريش. تفضل الإليزا على اختبار تثبيت المتمم لاختبار العينات الغنية بالفيروس مثل مسحات المجمع والمخاط والدم غير مناسبة للاختبار بتثبيت المتمم بسبب النشاط المضاد للمتمم (17).

ريتيكلوإندوثيليوسيس Reticuloendotheliosis

خواص فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس تكون مثالية للفيروسات السرطانية (46). الفيروس حوالي ١٠٠ نانوميتر ويتبرعم من غشاء البلازما. حزام الجزيئات عند ١,١٦ – ١,١٨ جم/سم^{3} في متدرج السكروز. مجين الحمض النووي الريبي لتكاثر العترات المؤهلة حوالي ٩ كيلو قاعدة. تعزل عديدات الدهون المتعددة شاملة اثنان من البروتينات النشوية (gp90 and gp20) وخمسة أخرى (p10, p12, pp18, pp20, p30)، منها p30 يمثل الأنتيجين المحدد للمجموعة الرئيسية. تحتوي الجزيئات أيضاً على الإنزيم الناسخ العكسي.

التعرف البيولوجي Biological Identification

ليكوسيس الطيور Avian Leukosis

يتكون اختبار الإليزا من مرحلتين وهما تنمية الفيروس في مزرعة خلايا أجنة الدجاج الليفية واختبار وجود فيروسات ليكوسيس الطيور باختبار السائل الرائق للأنتيجين محدد المجموعة بواسطة الإليزا.

لتنمية فيروسات ليكوسيس الطيور الخارجية (مجموعات A و B و C و D و J)، تستعمل مزرعة مزرعة خلايا أجنة الدجاج الليفية المقاومة للمجموعة E (خلايا C/E). لقياس الفيروسات الداخلية تستخدم الخلايا القابلة للإصابة بالمجموعة E لفيروس ليكوسيس الطيور.

١) علق الخلايا في وسط مزرعة الخلية عند تركيز ٢,٥ x ١٠ ٥/مل.

٢) أضف داي ميثيل أمينو إيثيل-دكستران (DEAE – dextran) أو بولي برين إلى معلق الخلية إلى تركيز نهائي ٢ ميكروجرام/مل.

٣) انقل ٢ مل من معلق الخلية إلى أطباق ٣٥ ملم، ويمكن استخدام أطباق مزرعة أخرى مناسبة مثل أطباق مزرعة الخلية ٢٤ أو ٤٨ حفرة.

٤) اختبر طبقاً لكل عينة بالإضافة إلى طبق لكل تخفيف من الفيروس الضابط تحت المعايرة (عادة ٦ أطباق، من ١٠ ‎-١ إلى ١٠ ‎-٦) للنموذج الأصلي لفيروس ليكوسيس الطيور، مثل فيروس-١ المرتبط بفيروس راوس (RAV-1) في حالة اختبار مجموعة A. في حالة اختبار عينات مجهولة، يوضع أيضاً طبقان لكل المجاميع الأخرى (B و C و D و J).

٥) في اليوم التالي أضف ١٠٠ ميكروليتر من العينة المراد أن تختبر إلى وسط مزرعة الخلية في الطبق المقابل، ويمكن أيضاً أن تضاف العينات إلى الأطباق في نفس اليوم التي زرعت فيه الخلايا. قلب الطعم إلى الوسط بالتدوير الهادئ لكل حامل أطباق.

٦) غير الوسط بعد إضافة العينات بحوالى ٢٤ ساعة.

٧) اضغط المزارع لمدة ٧ – ٩ أيام بعد الحقن. التغير الثاني للوسط ليس ضرورياً في حالة حفظ المزارع لسبعة أيام فقط.

٨) إذا كان هدف الاختبار هو لعزل الفيروس، اجمع ١ مل من الرائق من كل أطباق الاختبار إلى أنابيب معقمة واحفظها عند –٧٠°م حتى توافر نتائج الإليزا.

٩) أضف ٨٠ ميكروليتر من ٥٪ توين-٨٠ لكل طبق ٣٥ ملم، وجمد وأذب معلق الخلية مرتين قبل الاختبار للأنتيجين محدد المجموعة لفيروس ليكوسيس الطيور بالإليزا. لاختبار الأنتيجين محدد المجموعة بالإليزا، تتوافر أطباق الإليزا سابقة التغطية أو أطقم الكشف من مصادر تجارية مختلفة ويمكن أن تحضر الأطباق أيضاً في

المعمل باستخدام الجلوبيولين المناعي IgG المضاد لـ p27 والمحضر في الأرانب. أضف ١٠٠ ميكروليتر من تخفيف ١ : ١٠٠٠ (أو كما أوصى بواسطة المصنع) من الجلوبيولين المناعي السابق في محلول كربونات (بي إتش = ٩,٤) لكل حفرة لأطباق الإليزا. حضن الطبق عند درجة الغرفة (٢٥ °م) طوال الليل وبعد ذلك احفظه عند ٤ °م، ولا يجب أن تحفظ الأطباق المغطاة في المعمل لأكثر من ١٠ أيام. في حالة اختبار العينات بأطقم إليزا التجارية اتبع التعليمات وإلا يوصى بالطريقة العامة الآتية لإليزا فيروس ليكوسيس الطيور.

١٠) اسكب المحلول المغلف واصرف الأطباق، واغسلها ٣ مرات بواسطة محلول ملح الفوسفات المحتوي على ٠,١٪ توين–٨٠.

١١) لتقليل الارتباط غير النوعي وبالتالي الخلفية العالية، يمكن إضافة محلول ملح الفوسفات المحتوي على ١٪ زلال مصل الأبقار أو ١٠٠ ميكروليتر من ٥٪ لبن مجفف منزوع الدسم فوري التحضير (23) لكل حفرة لإغلاق السطح المتفاعل قبل إضافة عينات الاختبار إلى الأطباق، واتركه لفترة ٣٠ دقيقة عند ٢٥ °م.

١٢) أضف ١٠٠ ميكروليتر من مادة الاختبار لكل حفرة في طبق الإليزا. شاملاً في كل طبق حفر لعينات معلومة إيجابية وسالبة وأيضاً ضابط للقراءة.

١٣) حضن لفترة ساعة عند ٣٨ – ٤٠ °م.

١٤) بحرص اسكب المادة من الأطباق وجفف واغسل ثلاث مرات بمحلول ٠,١٪ توين-٨٠ في PBS.

١٥) أضف ١٠٠ ميكروليتر من (الجلوبيولين المناعي مضاد p27 المحضر في الأرنب والمقترن مع إنزيم بيروأكسيداز) لكل حفرة. يجب تحديد تخفيف المقترن بالمعايرة أو كما يوصي المصنع.

١٦) حضن لمدة ساعة عند ٣٨ – ٤٠ °م.

١٧) اسكب المقترن وجفف الطبق واغسل ثلاث مرات.

١٨) أضف ١٠٠ ميكروليتر من المادة المتفاعلة مع الإنزيم حديثة التحضير، مثل ٥-أمو حمض ساليساليك في ٢، ومحلول فوسفات جزيئي (بي إتش = ٧)، ويجب أن يتكون تفاعل اللون خلال ٣٠ دقيقة.

١٩) اقرأ الامتصاص عند ٤٩٠ نانومتراً في قارئ إليزا أو مقياس الطيف الضوئي آخر مناسب.

٢٠) العينات التي لها قيم امتصاص ٢، ووحدة فوق قيم العينات المعلوم سلبيتها تعتبر إيجابية.

اختبار خلط الأنماط الشكلية Phenotypic Mixing test (PM): يتطلب خلايا قابلة للإصابة بفيروسات مجموعة A و B و C و D و J (خلايا C/O) وخلايا C/E ومخزون فيروس راوس/ساركوما (RAV-O). يجب أن تكون الخلايا من أجنة خالية من فيروس ليكوسيس الطيور الخارجي والداخلي.

لتنمية الفيروس وخلط الأنماط ، ينمى ليكوسيس الطيور معاً مع راوس/ساركوما تحت ظروف ملائمة للخلط النمطى كالتالي :

١) جهز مزارع C/O الثانوية. تعلق الخلايا في وسط مزرعة الخلية المعامل بـ DEAE-dextran كما وصف سابقاً.

٢) أضف فيروس راوس/ساركوما RAV-O إلى التركيز ٢ x ١٠^٢ وحدة مكونة للبقع/مل.

٣) انقل ٢ مل من معلق الخلايا بفيروس راوس/ساركوما RAV-O إلى أطباق ٣٥ مل ، واختبر طبقاً لكل عينة بالإضافة إلى طبق لكل تخفيف لفيروس ليكوسيس الطيور المطلوب معايرته وعادة ١٠^-١ — ١٠^-٦ وطبقين للخليط راوس/ساركوما إضافي RAV-O (لم يحقن مع ليكوسيس الطيور أو العينات).

٤) في اليوم التالي ، غير وسط مزرعة النسيج خلال ساعتين ، وأضف ١٠٠ ميكروليتر من المواد المراد اختبارها في كل طبق.

٥) عند ١ — ٢ يوم بعد الحقن غير الوسط.

٦) احفظ المزرعة من ٥ — ٧ أيام بعد الحقن وعندما تكون الأطباق مساحات بؤرية واضحة لفيروس راوس ساركوما RAV-O الذي يحدث التحور. اجمع الرائق من الأطباق المختبرة والضابطة واطرد مركزياً عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١٠ — ١٥ دقيقة لترسيب كل الخلايا.

٧) يجب اختبار السوائل الرائقة لفيروس ليكوسيس الطيور مباشرة بعد الجمع أو تخزن عند —٧٠°م حتى تختبر.

في الاختبار وجود فيروسات راوس ساركوما المختلطة نمطياً ، وفيروسات راوس ساركوما التي لها غلاف فيروس ليكوسيس الطيور يجب أن تكتشف في نظام لا يكتشف فيروسات راوس ساركوما RAV-O ، التي هي في خلايا مقاومة وراثياً إلى مجموعة E من فيروس L/S.

٨) جهز مزارع خلايا أجنة الدجاج الليفية الثانوية C/E المعالجة بـ DEAE-dextran.

٩) انقل ٠,٥ مل من الرائق المجموع من المزارع المستخدمة في مرحلة نمو الفيروس إلى مزارع حديثة الزرع أو مزارع ٢٤ ساعة (C/E) في أطباق ٣٥ ملم.

١٠) في اليوم التالي ، تخلص من الوسط السائل واستبدله بوسط تغطية يحتوي ٠,٧٪ آجار وبعد ٢ — ٣ أيام من التغطية ، وقد يضاف ١ مل من وسط مزرعة النسيج بدون مصل عجول مدعم إلى الأطباق.

١١) احفظ الأطباق ٥ — ٧ أيام بعد الحقن ، وافحص الأطباق لبؤر فيروسات راوس ساركوما. أي طبق يظهر بؤراً يعتبر إيجابياً لفيروس ليكوسيس الطيور.

١٢) في حالة تنمية فيروس ليكوسيس الطيور لتوصيف أكثر ، تحفظ عينة من مواد الاختبار عند —٧٠°م حتى الحصول على نتائج اختبار الخلط النمطي. في الحالات الإيجابية يعزل الفيروس وينمى على مزارع C/E CEF.

تثبيت ا تمم رض ليكوسيس الطيور Complement Fixation: يجرى اختبار كوفال على مرحلتين كتنمية الفيروس وتحليل الأنتيجين بواسطة اختبار تثبيت المتمم. يستخدم لتكاثر الأنتيجين يستخدم خلايا أولية أو ثانوية C/E تفتقر إلى الفيروسات. يتطلب الاختبار محلل الدم ومتمماً من خنزير غينيا ومضاد مصل لأنتيجين فيروس ليكوسيس الطيور المحدد للمجموعة. تم وصف طريقة معايرة المكونات السابقة لعمل اختبار كوفال (44).

اختبار العامل ا سبب للمقاومـة Resistance-Inducing Factor Test: عند إصابة خلايا CEFs بفيروس ليكوسيس الطيور، وتصبح الخلايا مقاومة للتحور الذي يحدث بواسطة فيروس ساركوما الطيور من نفس المجموعة (33). اُستخدمت هذه الخاصية للتنافس كثيراً لاختبار فيروس ليكوسيس الطيور بواسطة اختبار RIF وأيضاً في تحديد مجموعة الفيروس (27). عندما يكون عدد البؤر الذي يحدث بواسطة عدداً قياسياً من فيروس ساركوما الطيورعلى الخلايا المختبرة حوالي ١٠٪ أو أقل من عدد البؤر في حالة الخلايا الحساسة المقارنة يدلل ذلك على وجود فيروس ليكوسيس الطيور. ويجب أن يشمل كل اختبار تجربة مقارنة موجبة وسالبة.

اختبار تنشيط ا لية غ ا نتجة Non-producer Cell Activation Test: يتطلب هذا الاختبار (32) الخلايا غير المنتجة التي تحورت بواسطة العترة المعيبة defective strain لفيروس RSV (Bryan high titer strain) والتي لا تنتج فيروساً قابلاً للكشف في الاختبارات المعتادة على خلايا C/E. استخدمت خط خلية السمان الياباني المتحور بواسطة عترة برايان ناقصة الغلاف لفيروس RSV (R(-)Q) كمصدر لجين فيروس ساركوما الطيور. تحقن عينات الاختبار على خلايا قابلة وراثياً وخالية من الفيروس، وبعد ذلك تزرع مشاركة مع الخلايا غير المنتجة. تختبر المزرعة المصابة بفيروس ليكوسيس الطيور باختبار الرائق في المزارع أو في أجنة الدجاج لوجود فيروس ساركوما الطيور. فيروس ليكوسيس الطيور وخلايا C/E تزرع مشاركة مع خلايا (R(-)Q) خارجياً، ويتم تقييم الرائق على خلايا C/E، كما يمكن أيضاً استخدام خلايا (R(-)Q) في التقييم داخلياً مع فيروس ليكوسيس الطيور وكذلك في تقييم العامل المساعد في الصوص (27).

قياس التحور (البؤرة) لف وسات ساركوما

Transformation (Focus) Assay for Sarcoma Viruses

تحور فيروسات ساركوما الطيور الشكل المغزلي المسطح لخلايا CEFs إلى بؤر كروية وانعكاسية والتي يمكن عدها بالفحص المجهري للمزارع (27). تكوين البؤرة بفيروس راوس ساركوما أفضل ما يشاهد في المزارع السابق تنميتها في قاعدة وسط ١٩٩ ووسط F-10 شوربة فوسفات تربتوز مصل عجل وبيكربونات الصوديوم. تحقن مزارع

CEF وحيدة الطبقة القابلة للإصابة وراثياً، وفي اليوم التالي يسكب الوسط ويستبدل بآجار التغطية (انظر اختبار الخلط النمطي). يجب فحص المزرعة يومياً للبؤر المحدثة بفيروس راوس ساركوما والذي يتطور عادة خلال ٤ — ٧ أيام بعد الحقن.

أجنة الدجاج Chicken Embryos

يمكن استخدام أجنة الدجاج المهيأة وراثياً لاختبار فيروس ليكوسيس الطيور وأيضاً فيروسات ساركوما الطيور عن طريق الحقن بالوريد أو كيس المح وتفقس الأجنة كصيصان طبيعية وتتكون الأورام فيما بعد مثل سرطان خلايا الدم الأم erythroblastosis والليكوسيس الليمفاوي (27). تحدث فيروسات ساركوما الطيور بقعاً على الغشاء الكوريوالانتويس ٨ أيام عقب الحقن. عادة تموت الأجنة المحقونة وريدياً بفيروسات ساركوما من الورم السرطاني والأنزفة خلال ٤ — ٥ أيام (27).

الدجاج Chickens

يستخدم للقياس داخل الجسم لفيروسات ليكوسيس الطيور ويجب أن يكون خالياً من الإصابة الفيروسية وقابلاً وراثياً لنمو الفيروس وتكوين الورم. الحقن البطني أو الوريدي للصوص عمر يوم القابل للإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور عادة يؤدي لتطور الليكوسيس الليمفاوي وأيضاً الأورام الأخرى (27). يعتمد الوقت المطلوب للقياس على الاستجابة المطلوب قياسها وطريقة القياس لمثل هذه الاستجابة. على سبيل المثال الاستجابة لليكوسيس الليمفاوي خلال ٣٦ أسبوعاً اعتماداً على الآفات التشريحية والنفوق بينما يمكن قياس هذه الاستجابة عند ١٦ — ١٨ أسبوعاً على أساس الفحص التشريحي والمجهري لبيرسا فايريسي. عامة يمكن تقليص الفترة المطلوبة لحدوث المرض مثل سرطان خلايا الدم في حالة حقن الدجاج أثناء الحياة الجنينية (27).

على عكس فيروسات ليكوسيس الطيور، فإن فيروسات ساركوما لا توجد في تجمعات الدجاج تحت الظروف الطبيعية. أكثر الطرق شيوعاً لقياس هذه الفيروسات هو الحقن تحت الجلد في الجناح في دجاج من ٤ — ٦ أسابيع. تتكون عادة أورام محسوسة خلال ٧ — ١٤ يوماً عند موضع الحقن. تتطور هذه الأورام بشدة وتنتشر مؤدية إلى قتل العائل أو تنحدر تدريجياً تاركة مظهراً طبيعياً للجناح ويعرف هذا الانحسار بأنه يتأثر بالعمر والنوع الجيني وجرعة الفيروس. الدجاج الذي يقاوم الأورام الحادثة بفيروس راوس ساركوما قد يتطور إلى ليكوسيس ليمفاوي لأن فيروسات ليكوسيس الطيور يشارك التواجد في معظم مخزون فيروس ساركوما. الحساسية تكون أفقر بعد ١٤ يوماً بمعظم الطرق وعلى الرغم من أن التركيزات العالية للفيروس قد تكتشف بعد فترات أقصر وقد تتواصل نقطة نهاية الاختبار بالإليزا خلال ٨ — ٩ أيام.

ريتيكلوإندوثيليوسيس Reticuloendotheliosis

توجد طرق عديدة لتوضيح فيروسات راوس ساركوما في مزارع الخلية، إلا أن توضيح الأنتيجينات بواسطة اختبارات التألق المناعي أو الإليزا هي الوسائل صاحبة الاختبار.

التألق ا ناعي Immunofluorescence

يحصل على المصل المضاد الإيجابي لفيروس راوس ساركوما بسهولة من دجاج متماثل للشفاء (29)، والمقترن المناعي مضاد لمصل الدجاج مع صبغة فلورسين يتوافر تجارياً والبديل هو استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة للفئران (11) والمضاد المقابل لها. تنمى العينة على خلايا CEFs وحيدة الطبقة على أطباق ٩٦ حفرة أو أطباق ٣٥ ملم أو على أغطية زجاجية ثم تصرف وتغسل بمحلول ملح الفوسفات وتثبت لمدة ٥ دقائق في خليط من ستة أجزاء أسيتون وأربعة أجزاء كحول ٩٥٪ وتجفف بالهواء. تصبغ فوراً أو تحفظ عند —٢٠° م حتى تختبر. للصباغة يستخدم التقنية القياسية للتألق المناعي. للمقارنة توضع ضوابط إيجابية وسالبة. يسهل استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة الحكم على الاختبار لوضوح الصبغة النوعية وغياب الخلفية.

الاختبار ا ناعي الإنز ي Enzyme Immunoassay

يعتمد هذا الاختبار على الأجسام المضادة وحيدة النسيلة التي تم وصفها (12). تغطى أطباق الإليزا بخليط من جسم مضاد وحيد النسيلة 11A25 و11C237 كل عند تخفيف ١ : ١٠٠٠ في محلول التغطية وتحضن الأطباق طوال الليل عند درجة الغرفة (انظر اختبار ELISA-ALV). عند الاختبار تعالج الحفر بكمية ٠,١ مل من العينات عقب دورتين تجميد وإذابة لإطلاق الأنتيجين. يشبه الاختبار تلك الطريقة الموصوفة سابقاً باستخدام تخفيف مناسب من مصل الأرنب المضاد لفيروس راوس ساركوما والمقترن المناعي IgG المضاد لمصل الأرنب والمعلم مع إنزيم بيروأكسيداز كأجسام مضادة أولية وثانوية على التوالي.

يمكن أن يحضر مصل الأرنب بحقن الأرنب تحت الجلد عند مواضع متعددة بكمية ٢ مجم من بروتين منقى من عترة T للفيروس بطريقة تدرج السكروز والمخفف في المحسن المناعي غير الكامل لفرويندز ويتبعها عند ٢١ و ٣٥ و ٤٩ يوماً بجرعات تنشيطية. يجمع المصل عند ٦٣ يوماً ويعرض للادمصاص مقابل خلايا CEF الطبيعية وبودرة كبد الدجاج المجفف بالأسيتون حتى تفشل في التفاعل مع خلايا الدجاج الطبيعية.

تثبيت ا تمم Complement Fixation

تؤخذ الخلايا من مزارع بعد الحقن بحوالي ١٤ يوماً وتختبر لأنتيجين فيروس راوس ساركوما النوعي باختبار تثبيت المتمم لفيروس راوس ساركوما الطيور (COFAR) (38). المضاد المتخصص specific anti-REV لفيروس راوس ساركوما يمكن الحصول عليه من الأرانب المعامل مناعياً بالفيروس النقي وتثبيت المتمم يجرى بوسيلة عادية (انظر اختبار COFAL).

اختبار النسخ الإنز ي العكسي Reverse Transcriptase

الخلايا من مزارع بعد الحقن بأسبوعين يمكن أن تستخدم أيضاً لهذا الاختبار (34). يجب استبعاد أمراض أخرى قبل إجراء هذا الاختبار في الطيور مثل فيروس ليكوسيس الطيور في الدجاج أو فيروس أنكورنا النوع C في الفزان أو مرض التكاثر الليمفاوي الفيروسي في الرومي (LPD) (4)، لأن هذه الفيروسات السابقة تحتوي على الأنزيم الناسخ العكسي.

التأث ا رضي ا لوي Cytopathic Effect

خلال ٥ — ٧ أيام من التمرير الأولي لفيروس راوس ساركوما، قد يشاهد تأثير مرضي خلوي قليل الدرجة (ليس دائماً)، ونادراً ما يبلغ هذا التأثير فقط الذروة في التدمير الكلي للمزرعة (42). حديثاً استخدم اختبار الإنزيم المناعي للبقع، وأظهر أنه حساس وطريقة معتمدة لكشف فيروس راوس ساركوما والجسم المضاد (6). مع أن فيروسات راوس ساركوما المعيوبة لم يتم التعرف عليها في السلالات الحقلية إلا أن ذلك لا يعني أنها غير موجودة. عزل سلالات جديدة معيوبة قد يحتاج طرقاً خاصة مثل التحوير الخارجي لخلايا نخاع العظم أو عدوى أجنة الطيور. سلالة T المعيوبة يمكنها أيضاً تحفيز بؤر الخلايا المحورة في مزارع أجنة السمان (21) والتي يمكن أن تشارك كطريقة تقييم.

التعريف ا زيئي Molecular Identification

مرض ليكوسيس الطيور Avian Leukosis

يمكن استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل النوعي لمجموعة A لفيروس ليكوسيس الطيور لاكتشاف الحمض النووى دي إن إيه والحمض الفيروسي آر إن إيه في الأنسجة المختلفة من دجاج مصاب بفيروس ليكوسيس الطيور (45). يستخدم تفاعل البلمرة بوادئ تعتمد على تتابع تكرار النهايات الطويلة لنموذج الفيروس proviral long terminal repeat (LTR) عند النهاية ´3 منطقة (U3) وتلك التتابعات المتبقية U5 يمكن أن تستخدم

لكشف الفيروس الخارجي وليس الداخلي لفيروسات ليكوسيس الطيور (E. J. Smith, press. comm.). النموذج الفيروسي لحمض دي إن إيه من خلايا CEFs مصابة أو أورام سوف يتهجن مع المسابير الخاصة مثل pRAV-2 ويمكن أن يكتشف بواسطة اختبار الشف النقطي أو شف ساوثرن (27).

ريتيكلواندوثيليوسيس Reticuloendotheliosis

تفاعل البلمرة المتسلسل الذي يعظم تتابع ٢٩١ قاعدة زوجية منتجة لفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس (REV LTR) أظهر حديثاً أنه طريقة حساسة ونوعية لكشف العترات المختلفة لفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس في خلايا CEFs المصابة وكما في الدم والأورام من الطيور المصابة (1 ,13). يمكن أن يستخدم تفاعل البلمرة وتفاعل البلمرة مع الإنزيم العكسي الناسخ أيضاً في كشف فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس في اللقاحات الملوثة (19 ,30 ,41).

نموذج حمض دي إن إيه من مزارع الخلية أو الأورام سوف يتزاوج مع المسابير النوعية مثل pSNV ويمكن أن تكتشف بواسطة الشف النقطي أو تحليل شف ساوثيرن (46). مثل هذه الاختبارات لها نوعية قوية ويجب أن تكون مساندة في تأكيد تشابه المعزولات الافتراضية.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

ليكوسيس الطيور Avian Leukosis

اختبار تعادل الف وس Virus-Neutralization (VN)

هو اختبار أكثر حساسية يستخدم لتحديد الجسم المضاد النوعي للمجموعة لفيروسات L/S في الدجاج. يمكن أن يحضر مخزونات فيروس راوس ساركوما وفيروس ليكوسيس الطيور بحقن مزارع CEF القابلة للإصابة. تزرع المزارع المصابة مرة تالية أو تنقل السوائل الرائقة إلى مزارع جديدة تستخدم لزيادة مستوى الإصابة. تجمع السوائل الرائقة من مزارع CEF مجهزة من أجنة مصابة وراثياً بفيروس ليكوسيس الطيور ويمكن أن تستخدم كمصدر لفيروس ليكوسيس الطيور. يمكن أن تستخدم الأورام المتكونة في الجناح أو عضلات الصدر كمصدر لفيروس راوس ساركوما (27). مضادات المصل النوعية المرجعية للمجموعة لفيروس راوس ساركوما يمكن أن تجمع من دجاج به أورام متضائلة محدثة بواسطة فيروس معين. يمكن أن يحضر الجسم المضاد لفيروس ليكوسيس الطيور بحقن دجاج عمر ٤ — ٦ أسابيع قابل للإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور معين، ويمكن حصد الأمصال عند ٦ — ١٦ أسبوعاً بعد الإصابة معتمداً على النوع الجيني للدجاج وعترة الفيروس المستخدم.

يقاس الجسم المضاد لفيروس ليكوسيس الطيور بتفاعله مع فيروس راوس ساركوما، ويتحدد تعادل الفيروس بواسطة أي طريقة تقييم لفيروس راوس ساركوما (مثلاً في الدجاج أو أجنة الدجاج أو مزرعة الخلية)

(27). يمكن أن يستعمل أيضاً اختبار التعادل الدقيق الذي يستخدم فيروس ليكوسيس الطيور كفيروس كاشف (16). يمكن أن يجرى الاختبار في أطباق ٩٦ حفرة ويتحدد تعادل الفيروس بالإليزا على سوائل المزرعة.

تقييم اختزال بؤرة فـ وس راوس ساركوما

Rous Sarcoma Virus-Focus Reduction Assay

هذا الاختبار لمضادات فيروس L/S يجرى على النحو التالي:

١) يخفف السيرم بنسبة حجم واحد إلى خمسة أحجام ويجرى له عدم تنشيط لمدة ٣٠ دقيقة على درجة حرارة ٥٦°م في حمام مائي.

٢) يتم تقدير تخفيف RSV الذي يعطي حوالي ١٠٠ أو ١٥٠٠ وحدة تكوين بؤري للفيروس على التوالي، وعندما تعد البؤر بالعين المجردة أو ميكروسكوبيا. مجهز RSV الذي يتم الشغل به بعد ذلك يجب أن يكون تركيزه ضعف التركيز المقدر في الخطوة الثانية. على سبيل المثال، إذا كان التخفيف ١ : ٢٠٠ يعطي ١٠٠ بؤرة لكل طبق فإن المجهز الذي يجب الشغل عليه يجب أن يكون بمعدل تخفيف ١ : ١٠٠.

٣) اخلط أحجاماً متساوية من مجهز RSV مع السيرم غير النشط وحضن المخلوط على درجة ٣٧°م لمدة ٤٠ دقيقة.

٤) قيم المتبقي من الفيروس في مزارع CEF الحساسة.

٥) اعمل تجربة مقارنة موجبة وأخرى سالبة للسيرم.

٦) سجل عدد البؤر RSV عند اليوم السابع. عينة السيرم التي تقلل عدد البؤر بحوالي ٩٠٪ أو أكثر بالمقارنة سالبة السيرم تعتبر ايجابية لمضادات الأجسام antibody. السيرم السالب يجب أن يفشل في تثبيط الفيروس وهنا عدد البور يجب أن يقارن بالعدد في المقارنة التي تحوي فيروساً فقط.

اختبار التعادل الدقيق - الإليزا Microneutralization-ELISA

يجرى على مرحلتين: تعادل الفيروس ومعايرة فيروس ليكوسيس الطيور المتبقي في سوائل المزرعة بواسطة الإليزا.

تعادل الفيروس يجرى كالتالي:

١) تعامل الأمصال لمدة ٣٠ دقيقة عند ٥٦°م، وخفف الأمصال ١ : ٥ في وسط مزرعة الخلية بدون مصل.

٢) حدد تخفيف فيروس ليكوسيس الطيور الذى يعطي ٥٠٠ — ١٠٠٠ وحدة معدية من الفيروس/مل. استعمل RAV-2 و RAV-49 و RAV-50، محطة بحوث هاوتون (HPRS-103) أو RAV-O لمعايرة الجسم المضاد لفيروس AL المجاميع A أو B أو C أو D أو J أو E على التوالي.

٣) أضف ٥٠ ميكروليتراً من الفيروس المجهز لكل حفرة في طبق معايرة دقيق عدا ٣ — ٥ حفر لتستخدم كضوابط للخلية.

٤) أضف ٥٠ ميكروليتراً من المصل المراد اختباره المثبط والمخفف إلى الحفر، واخلط المصل مع الفيروس بسحب محتويات الحفرة إلى الماصة من مرتين إلى ثلاث مرات.

٥) توضع أمصال إيجابية وسلبية ضابطة.

٦) حضن الأطباق عند ٣٧ ° م لمدة ٤٠ دقيقة.

٧) أضف ٥ x $١٠^{٤}$ CEF_S، ويجب أن تكون الخلايا خالية من الفيروس الداخلي والأنتيجين.

٨) حضن الأطباق لمدة أسبوع بدون تغيير الوسط.

٩) أضف ٢٠ ميكروليتراً من ٥٪ توين ٨٠ لكل حفرة، وجمد وأذب على الأقل مرتين قبل اختبار السائل الرائق بواسطة الإليزا. لمعايرة فيروس ليكوسيس الطيور المتبقي، انظر الفقرة عن معايرة أنتيجين فيروسات ليكوسيس الطيور محدد المجموعة بالإليزا. النتيجة السلبية تدل أن المصل موجب للجسم المضاد لفيروس ليكوسيس الطيور، والإليزا الإيجابية تدل على أن المصل سالب للجسم المضاد.

تطورت الإليزا المباشرة لفيروس ليكوسيس الطيور (الجسم المضاد) (37) قد تحدث النتائج السلبية الوهمية نتيجة التفاعلات التصالبية، وخاصة إذا كان الجسم المضاد للفيروس الداخلي موجود.

ريتكلوانديثليوسيس Reticuloendotheliosis

تأكيد هذه الإصابة بالطرق المصلية تضم تقييم الأمصال من طيور معرضة طبيعياً في قطيع مشتبه. تحث الأجسام المضادة بتكرارات مختلفة وتظل لأزمنة مختلفة. الطيور المصابة وراثياً أو المحقونة بجرعات عالية مثل الأجنة قد تكون حاملة للفيروس بشكل دائم وتفشل في تكوين أجسام مناعية. يجب أن تختبر على الأقل ١٠ — ١٥ مصلاً لكل مجموعة أو قطيع، ولا يوصى بجمع الأمصال في مصل واحد.

التألق ا ناعي غ ا باشر Indirect Immunofluorescence

هو اختبار مفيد لكشف فيروس راوس ساركوما (الأجسام المضادة) في الأمصال ومستخلص صفار البيض (29). تعدى أطباق مزارع CEF ٩٦ حفرة بحوالي ٥٠ — ١٠٠ وحدة مكونة لبؤرة التألق لفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس تنمى لفترة ٣ - ٥ أيام تحت الوسط السائل وتثبيت. تستخدم الأمصال المجهولة عند تخفيف ١ : ٢٠ في اختبار الصبغة كما وصف مبكراً في عزل الفيروس. الضوابط مع مصل عادي ومضادات مصل مغايرة على كلٍّ من المزارع المصابة وغير المصابة تكون ضرورية. الاختبارات على أمصال من أنواع طيور أخرى تتطلب مضاد جلوبيولين مقترن بالصبغة المناسبة.

الاختبار ا ناعي الإنز ي Enzyme Immunoassay

يمكن استخدام الإليزا غير المباشرة في أطباق ٩٦ حفرة أيضاً لكشف الأجسام المضادة لفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس في أمصال الدجاج (39). يبدو هذا الاختبار أكثر حساسية عن التألق المناعي أو تعادل المصل، إلا أن الأمصال يجب أن تخفف ١ : ٢٠٠ إلى ١ : ٤٠٠ لتجنب التفاعلات الإيجابية الكاذبة. تتوفر أطقم الاختبار التجارية للكشف عن الأجسام المضادة للفيروس.

اختبار الترسيب الآجار Agar-Gel Precipitin Test

تكون الأمصال المحتوية على جسم مضاد من دجاج مصاب بفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس خطوط نوعية خلال ٢٤ – ٧٢ ساعة في اختبار الترسيب عندما تتفاعل مقابل الأنتيجينات المناسبة، على سبيل المثال، مستخلص مزارع الخلية المصابة، أو الرائق من مزارع الخلية المصابة المركز ١٠٠ مرة، أو بلازما الدجاج حامل الفيروس في الدم، أو جزيئات الفيروس المركزة بالطرد المركزي فائق السرعة ومناطق الكثافة المتدرجة في السكروز (22).

يمكن اكتشاف أيٍّ من الأنتيجين أو الجسم المضاد في عينات الاختبار بنظام اختبار حيث يوضع فيه أنتيجين إيجابي بجانب بعض في الحفر الطرفية (22)، ويجب أن تؤكد نوعية خطوط الترسيب بواسطة تفاعلات التشابه مع الضوابط الموجبة في الحفر المجاورة.

تعادل الف وس Virus Neutralization

يستخدم لكشف الجسم المضاد عند عدم إمكانية فحص الأمصال بالتألق المناعي غير المباشر أو عند الحاجة لتأكيد نتائج اختبارات التألق والترسيب. يمكن استخدام أطباق ٩٦ حفرة (7). توضع تخفيفات مزدوجة ثنائية لكل اختبار ومصل ضابط في وسط المزرعة بدون مصل عجل في أطباق المعايرة بمعدل ٠,٠٥ مل لكل حفرة. يضاف لكل حفرة حجم مساوٍ من النموذج الأصلي لفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس (عترة T أو CS) يحتوي حوالي ١٦ وحدة معدية كما تحدد بالمعايرة التلقائية. بعد التحضين لمدة ٣٠ دقيقة عند ٣٧ ْم، يضاف CEF_S لكل حفرة ويحضن الطبق لمدة ثلاثة أيام عند ٣٨ ْم في حضان خلايا رطب مع ٥٪ ثاني أكسيد الكربون. مزارع الطبقة الواحدة في كل حفرة تثبت بعد ذلك وتصبغ بالتألق غير المباشر كما وصف سابقاً. تؤخذ قراءات الحفر كإيجابية أو سالبة للفيروس عقب الفحص المجهري. معيار التعادل هو أعلى تخفيف للمصل الذي يعادل فيروس الاختبار. البديل، يمكن استخدام الإليزا لمعايرة فيروس ريتكلوإندوثيليوسيس المتبقي.

التفريق من العوامل ا مرضة قريبة الصلة Differentiation from Closely Related Agents

ليكوسيس الطيور Avian Leukosis

تتشارك فيروسات مجموعة ليكوسيس/ساركوما في أنتيجين محدد للمجموعة وبعض الخواص الفريدة مثل القابلية للتفاعل مع الأعضاء الأخرى من المجموعة في اختبارات RIF و PM وتثبيت المتمم (27). يمكن تفريق مجموعة الفيروسات هذه من الفيروسات السرطانية الأخرى للطيور مع شكل الجزيء النوع C، مثل فيروس ريتكلوإندوثيليوسيس على أسس الأنتيجين المتفرد المحدد للمجموعة.والنسخ العكسي الإنزيمي والكثافة ١,١٦. تقسم فيروسات L/S حسب طيف السرطانات التي تحدثها (النوع المرضي) مجاميع الغلاف الفيروسي. عرفت حالة سرطانية في الرومي بمرض التكاثر الليمفاوي التي يسببها فيروس أنكورنا آخر متميز عن ليكوسيس/ساركوما وفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس (4).

الأنواع ا رضية Pathotypes

فيروسات مجموعة ليكوسيس/ساركوما الطيور التي تحدث أوراماً على مدى طويل (الفيروسات بطيئة التحور) تعرف كفيروسات ليكوسيس الطيور، بينما الفيروسات التي تسبب سرطانات حادة (خلال ٢ - ٦ أسبوع) تعرف كفيروسات ساركوما الطيور والليوكيميا المعيبة.

تباين ا موعة والعترة Subgroup and Strain Variability

تقسم فيروسات مجموعة ليكوسيس/ساركوما الطيور في الدجاج إلى ٦ مجاميع (A و B و C و D و E و J) على أسس مدى عوائلها في خلايا الدجاج المختلفة وراثياً، وتداخلها مع تحورات مزارع CEF بواسطة أعضاء فيروسات راوس ساركوما من نفس المجموعة والغلاف الفيروسي المكون للأنتيجين المكتشف باختبارات التعادل (27). المجموعة E لفيروس ليكوسيس الطيور هي فيروسات ليكوسيس الطيور داخلية في الدجاج تعرف بقلة إمراضيتها. مجموعة أخرى من فيروسات ليكوسيس/ساركوما الداخلية عزلت من الفزان (G, F) والعصافير المجرية (H) والسمان (I) (27). العزلات المعملية والحقلية التابعة لمجموعة فيروس L/S تصطلح عادة بسلالات المجموعة. حدوث المقاومة ووجود الدرنة يتأثر بسلالة الفيروسات (27).

صفات عترات اللقاح Characteristics of Vaccine Strains

لا توجد لقاحات تجارية لحماية الدجاج من الإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور. نتائج التحصين التجريبيي بفيروس ليكوسيس الطيور الحي على إفراز الفيروس والانتقال الوراثي أو التناسلي كانت غامضة (27). استخدم

فيروسات ليكوسيس/ساركوما المكونة جينياً التجريبية كلقاحات (27 ,48) قد تثبت أنها ذات قيمة للبرامج الحالية لتقليل أو مكافحة عدوى فيروس ليكوسيس الطيور.

ريتكلوإنديثليوسيس Reticuloendotheliosis

تباين العترة Strain Variability

كل فيروسات ريتكلوإندوثيليوسيس بغض النظر عن غموض أنواع المصدر ترتبط أنتيجينياً لبعضها البعض وتتميز مصلياً من كل فيروسات أنكورنا، إلا أن التوصيف الأنتيجيني لمعزولات فيروسات ريتكلوإندوثيليوسيس المختلفة باستعمال ١١ جسماً مضاداً وحيد النسيلة (9) أثبتت وجود ثلاثة أنماط مختلفة A و B و C (7).

المتلازمات المثبطة للمناعة المحثة بواسطة فيروسات ريتكلوإندوثيليوسيس يمكن أن تتفرق عادة من الآفات المتكونة في مرض جمبورو أو فيروس أنيميا الدجاج بالفحص النسيجي. ضمور الأعضاء الليمفاوية مع التثبيط المناعي وآفات العصب والتطور غير الطبيعي للريش تميز المرض المثبط للمناعة المحدث بواسطة فيروسات ريتكلوإندوثيليوسيس.

صفات عترات اللقاح Characteristics of Vaccine Strains

لا توجد لقاحات ويشمل السيطرة على المرض إزالة الدجاج المفرز للفيروس من قطعان التربية وحملية النسل ضد الإصابة الأفقية خلال الرعاية الجيدة والعزل الشديد (47).

التشخيص ا قارن للأورام ا سببة بف وس أنكورنا الطيور
Differential Diagnosis of Avian Oncornavirus-Induced Tumors

يمكن أن تتداخل الأورام المسببة بواسطة فيروسات مجموعة ليكوسيس/ساركوما مع تلك الأمراض ذات الطبيعة التكاثرية للخلايا الليمفاوية مثل الأورام المشاهدة في مرض مارك وريتكلوإندوثيليوسيس (36). بسبب انتشار فيروسات ليكوسيس الطيور وفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس وفيروس مرض مارك والإصابة في غياب تكون الورم تكون شائعة فإن الصفات الفيرولوجية والمصلية نادراً ما تساند التشخيص النهائي، ويمكن أن تستخدم التقنيات المعتمدة على التهجين الجزيئي أو الكيمياء المناعية مع الأجسام المضادة أحادية النسيلة للأنتيجينات الخلوية في التشخيص المقارن. الأورام الليمفاوية الناشئة من فيروسات أنكوآر إن إيه الطيور تنشأ من إما خلايا B (ALV, REV) أو خلايا T (5 ,27 ,46). هذه الصفات تعطي الأساس للاختبارات التي تفرق بين أورام خلية B وخلية T باستخدام أجسام مضادة عديدة غير نوعية وأجسام مضادة أحادية نوعية لأنتيجينات سطح الخلية للخلايا الليمفاوية B و T (24).

لأن فيروس ليكوسيس الطيور وفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس غير المعيبة لا يمتلك جين *onc*-(v) الفيروسي، فإنه لا يحور الخلايا المستهدفة بالالتحام مع جين *onc*-(v) الخلوي مثل c-*myc* مؤدياً إلى زيادة تعبير مثل هذا الجين. التعبير الزائد للجين c-*myc* يعتقد أنه يبدأ عملية جينية ليمفاوية. التغير الجزيئي هو الأسس لاختبار الحمض النووي دي إن إيه السرطاني للتشخيص النهائي الأورام الليمفاوية لفيروس فيروس ليكوسيس الطيور وفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس. باستخدام مسابير مناسبة مثل pRAV-2 أو pSNV أو c-*myc*، تستخدم تقنيات شف ساوترن والتهجين للحمض النووي دي إن إيه الخاص بالورم لاكتشاف الانزراع التناسخي لفيروسي ليكوسيس الطيور وريتكلوإندوثيليوسيس (النموذج الأولي) والتغير في c-*myc* (46, 27).

حديثاً يسمح استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل باكتشاف نسختين من تكرار القاعدة الزوجية ١٣٢ في الحمض النووي دي إن إيه المستخلص من سرطانات مرض مارك لكن ليس من دي إن إيه المستخلص من السرطانات المسببة بفيروس ليكوسيس الطيور أو فيروس ريتكلوإندوثيليوسيس(5). تحتوي سرطانات مرض مارك على تكرار عالي من الخلايا المصابة ونسخ أكثر لحمض دي إن إيه الفيروسي لكل خلية مصابة أكثر من الموجودة نمطياً في أنسجة الدجاج غير الحامل للمرض (5). أيضاً أوضح تفاعل البلمرة المتسلسل قدرته على اكتشاف تتابعات فيروس ريتكلوإندوثيليوسيس LTR من سرطانات ليمفاوية وأفخاخ الدجاج المصابة بفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس، لكن ليس من دي إن إيه من الليكوسيس الليمفاوي أو أورام مرض مارك (1 ,13 ,19). يوضح اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل وجود أو غياب الفيروس المتعلق ولذلك له نفس المحددات لتشخيص الورم كما في عزل الفيروس.

المراجع References

1. Aly, M. M., E. J. Smith, and A. M. Fadly. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. Avian Pathol. 22:543-554. 1993.
2. Aly, M. M., R. L. Witter, and A. M. Fadly. Enhancement of reticuloendotheliosis virus-induced bursal lymphomas by serotype 2 Marek's disease virus. Avian Pathol. 25:81-94. 1996.
3. Bacon, L. D., R. L. Witter, and A. M. Fadly. Augmentation of oncomavirus-induced lymphoid leukosis by Marek's disease herpesviruses in white leghorn chickens. J. Virol. 63:504-512. 1989.
4. Biggs, P. M. Lymphoproliferative disease of turkeys. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 485-488. 1997.
5. Calnek, B. W., and R. L. Witter. Marek's disease. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 369-413. 1997.
6. Calvert, J. G., and K. Nazerian. An immunoperoxidase plaque assay for reticuloendotheliosis virus and its application to a sensitive serum neutralization assay. Avian Dis. 38:165-171. 1994.
7. Chen, P. Y., Z. Cut, L. F. Lee, and R. L. Witter. Serologic differences among non-defective reticuloendotheliosis viruses. Arch. Virol. 93:233-245. 1987.
8. Cho, B. R. Cytopathic effects and focus formation by reticuloendotheliosis viruses in a quail fibroblast cell line. Avian Dis. 27:261-270. 1983.

9. Crittenden, L. B., S. McMahon, M. S. Halpem, and A. M. Fadly. Embryonic infection with the endogenous avian leukosis virus Rous-associated virus-0 alters response to exogenous avian leukosis virus infection. J. Virol. 61:722-725. 1987.
10. Crittenden, L. B., and E. J. Smith. A comparison of test materials for differentiating avian leukosis virus group-specific antigens of endogenous and exogenous origin. Avian Dis. 28:1057-1070. 1984.
11. Cut, Z., L. F. Lee, R. F. Silva, and R. L. Witter. Monoclonal antibodies against avian reticuloendotheliosis virus: identification of strain specific and strain common epitopes. J. Immunol. 136:4237-4242. 1986.
12. Cut, Z., L. F. Lee, E. J. Smith, R. L. Witter, and T. S. Chang. Monoclonal-antibody-mediated enzyme-linked immunosorbent assay for detection of reticuloendotheliosis viruses. Avian Dis. 32:32-40. 1988.
13. Davidson, I., A. Borovskay, S. Peri, and M. Malkinson. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. Avian Pathol. 24:69-94. 1995.
14. DeBoer, G. F., and A.D.M.E. Osterhaus. Application of monoclonal antibodies in the avian leukosis virus gs-antigen ELISA. Avian Pathol. 14:39-55. 1985.
15. Ewert, D. L., and G. F. DeBoer. Avian lymphoid leukosis: mechanism of lymphoma genesis. In: Immunodeficiency disorders. K. Perk, ed. Academic Press, Boston, Mass., pp. 37-53. 1988.
16. Fadly, A. M., T. F. Davison, L. N. Payne, and K. Howe. Avian leukosis virus infection and shedding in brown leghorn chickens treated with corticosterone or exposed to various stressors. Avian Pathol. 18:283-298. 1989.
17. Fadly, A. M., W. Okazaki, E. J. Smith, and L. B. Crittenden. Relative efficiency of test procedures to detect lymphoid leukosis virus infection. Poult. Sci. 60:2037-2044. 1981.
18. Fadly, A. M., and R. L. Witter. Effects of age at infection with serotype 2 Marek's disease virus on enhancement of avian leukosis virus-induced lymphomas. Avian Pathol 22:565-576. 1995.
19. Fadly, A. M., R. L. Witter, E. J. Smith, R. F. Silva, W. M. Reed, F. J. Hoerr, and M. R. Putnam. An outbreak of lymphomas in commercial broiler breeder chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus. Avian Pathol. 25:35-47. 1996.
20. Glika, F., and J. L. Spencer. Immunohistochemical identification of group specific antigen in avian leukosis virus infected chickens. Can. J. Comp. Med. 48:322-326. 1984.
21. Hoelzer, J. D., R. B. Franklin, and H. R. Bose. Transformation by reticuloendotheliosis virus: development of a focus assay and isolation of a non-transforming virus. Virology 93:20-30. 1979.
22. Ianconescu, M. Reticuloendotheliosis antigen for the agar gel precipitation test. Avian Pathol. 6:259-267. 1977.
23. Johnson, D. A., J. W. Guatsch, J. R. Sportsman, and J. H. Eder. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. Gene Anal. Tech. 1:3-8. 1984.
24. Neumann, U., and R. L. Witter. Differential diagnosis of lymphoid leukosis and Marek's disease by tumor-associated criteria. I. Studies on experimentally infected chickens. Avian Dis. 23:417-425. 1979.
25. Okazaki, W., H. G. Purchase, and B. R. Burmester. Phenotypic mixing test to detect and assay avian leukosis viruses. Avian Dis. 19:311-317. 1975.
26. Payne, L. N., S. R. Brown, N. Bumstead, K. Howes, J. A. Frazier, and M. E. Thouless. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. J. Gen. Virol. 72:801-807. 1991
27. Payne, L. N., and A. M. Fadly. Leukosis/sarcoma group. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowas. pp. 414-466. 1997.
28. Payne, L. N., A. M. Gillespie, and K. Howes. Unsuitability of chicken sera for detection of exogenous ALV by the group-specific antigen ELISA. Vet. Rec. 132:555-557. 1993.
29. Purchase, H. G., C. G. Ludford, K. Nazerian, and H. W. Cox. A new group of oncogenic viruses: reticuloendotheliosis, chick syncytial, duck infectious anemia, and spleen necrosis viruses. J. Natl. Cancer Inst. 51:489-499. 1973.
30. Reimann, I, and O. Werner. Use of polymerase chain reaction for the detection of reticuloendotheliosis virus in Marek's disease vaccines and chicken tissues. J. Vet. Med. 43:75-84. 1996.
31. Rodriguez, F. R., and F. Deinhardt. Preparation of a semi-permanent mounting medium for fluorescent antibody studies. Virology 12:316-317. 1960.
32. Rispens, B. H., P. A. Long, W. Okazaki, and B. R. Burmester. The NP activation test for assay of avian leukosis/sarcoma viruses. Avian Dis. 14:738-751. 1970.

33. Rubin, H. A virus in chick embryos which induces resistance in vitro to infection with Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46:1105-1119. 1960.
34. Sarma, P. S., D. K. Jain, H. K. Mishra, J. L. Vernon, P. S. Paul, and B. S. Pomeroy. Isolation and characterization of viruses from natural outbreaks of reticuloendotheliosis in turkeys. J. Natl. Cancer Inst. 54:1355-1359. 1975.
35. Sarma, P. S., H. C. Turner, and R. J. Huebner. An avian leukosis group-specific complement-fixation reaction. Application for the detection and assay of non-cytopathogenic leukosis viruses. Virology 23:313-321. 1964.
36. Siccardi, F. J., and B. R. Burmester. The differential diagnosis of lymphoid leukosis and Marek's disease. USDA Technical Bulletin 1412. 1970.
37. Smith, E. J., A. M. Fadly, and L. B. Crittenden. Observations on an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against avian leukosis-sarcoma viruses. Avian Dis. 30:488-493. 1986.
38. Smith, E. J., J. J. Solomon, and R. L. Witter. Complement-fixation test for reticuloendotheliosis viruses: limits of sensitivity in infected avian cells. Avian Dis. 21:612-622. 1977.
39. Smith, E. J., and R. L. Witter. Detection of antibodies against reticuloendotheliosis viruses by an enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 27:225-234. 1983.
40. Spencer, J. L., L. B. Crittenden, B. R. Burmester, C. Romero, and R. L. Witter. Lymphoid leukosis viruses, and gs antigen in unincubated chicken eggs. Avian Pathol. 5:221-226. 1976.
41. Takagi, M., I. Kiyoyasu, N. Hideki, T. Sasaki, G. Kisako, and H. Koyama. Detection of contamination of vaccines with the reticuloendotheliosis virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Virus Res. 40:113-121. 1996.
42. Temin, H. M., and V. K. Kassner. Replication of reticuloendotheliosis viruses in cell cultures: acute infection. J. Virol. 13:291-297. 1974.
43. Theilen, G. H., R. F. Zeigel, and M. J. Twiehaus. Biological studies with RE virus (strain T) that induces reticuloendotheliosis in turkeys, chickens, and Japanese quail. J. Natl. Cancer Inst. 37:731-743. 1966.
44. U.S. Department of Agriculture, SAM-405. Supplemental assay method for detecting lymphoid leukosis biocontamination by the COFAL test. Biologics Laboratories, Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service, Ames, Iowa. 1973.
45. Van Woensel, P. A. M., A. van Blaaderen, R. J. M. Mooman, and G. F. de Boer. Detection of proviral DNA and viral RNA in various tissues early after avian leukosis virus infection. Leukemia 6(Suppl. 3):1355-1375. 1992.
46. Witter, R.L. Reticuloendotheliosis. In: Diseases of Poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. Mc Dougald and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 467-484. 1997.
47. Witter, R. L., and D. W. Salter. Vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in breeder turkeys. Avian Dis. 33:226-235. 1989.
48. Wright, S. E., and D. D. Bennett. Avian oncomavirus recombinant expressing foreign envelope delays tumour formation of ASV-A-induced sarcoma. Vaccine 10:375-378. 1992.



الفصل الخامس والثلاثون

التهاب المخ الطيري (الارتعاش الوبائي)
AVIAN ENCEPHALOMYELITIS

لويس فان دير هيد
Louis van der Heide

الملخص Summary

التهاب المخ الطيري (AE) أو الارتعاش الوبائي هو مرض فيروسي معدي يصيب الدواجن ويتسبب بواسطة فيروس بيكورنا. الدجاج والرومي والفزان والسمان معرضين للإصابة الطبيعية. التهاب المخ الطيري هو مرض ينتقل عن طريق البيض. إذا أصيب دجاج الأمهات بالفيروس أثناء الإنتاج فقد يظهر على النسل الناتج أعراض المرض في الأربعة الأسابيع الأولى من الحياة. قد يحدث الانتقال الأفقي أيضاً بين الصيصان المصابة والمعرضة أو بين الطيور البالغة أيضاً. تمثل خسائر الصوص وانخفاض إنتاج البيض أهم العوامل الاقتصادية الرئيسية لمرض التهاب المخ الطيري.

تعريف المسبب Agent Identification

الاختبارات الأولية التشخيصية المفضلة هي عزل الفيروس في أجنة بيض الدجاج عند عمر ستة أيام بحقن كيس المح و/أو إظهار الأنتيجين الفيروسي في الأنسجة من الدواجن المشتبهة.

الكشف المصلي في العائل Serologic Detection in the Host

تتعرف الاختبارات التشخيصية الثانوية على الأجسام المضادة للفيروس في أمصال الدواجن المشتبهة بواسطة اختبار تعادل الفيروس مستخدماً العترة المتأقلمة على الجنين فان روكيل Van Roekel لفيروس التهاب المخ الطيري أو اختبار الإليزا أو اختبار قابلية جنين الدجاج للإصابة chicken embryo susceptibility test.

ا قدمة Introduction

التهاب المخ الطيري هو مرض فيروسي معدي في الدواجن والذي يتميز في الدجاج الصغير أو الرومي أو الفزان أو السمان بأعراض اختلال الجهاز العصبي المركزي مع إصابة عالية ونفوق متفاوت. يمكن أن تصاب الطيور الأكبر لكن نادراً ما تتطور إلى أعراض مرضية.

أُعطي اسم الارتعاش الوبائي للمرض بواسطة د. إليزابيث جونز في عام ١٩٣٤م (11). في عام ١٩٣٩م كان اسم التهاب المخ الطيري هو المقبول رسمياً، وهو مرض ينتقل عن طريق البيض ومن ثم تحصين الأمهات يكون إجراء وقائياً ضرورياً ضد المرض.

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

يتميز المرض في الصوص الصغير عمر ١ — ٤ أسابيع بالأعراض العصبية مثل الشلل واختلال الحركة وارتعاشات سريعة للرأس والرقبة. الآفات العينية تقتصر أحياناً على العمى من تراكم الماء في العين كنتيجة للإصابة. تشمل الآفات المجهرية تدميراً في الخلايا العصبية (خلايا الشبح) وخاصة في النخاع والقرون الأمامية للحبل الشوكي الفقري. قد يوجد العديد من التجمعات الليمفاوية المستديرة في البنكرياس وفي النسيج العضلي للمعدة العضلية (10).

في الطيور البالغة البياضة، لا تسبب الإصابة بفيروس التهاب المخ أعراضاً عصبية لكنها تخفض إنتاج البيض بنسبة ١٠٪ - ١٥٪ على أسس القطيع. يرجع إنتاج البيض إلى المستوى الطبيعي في حوالي أسبوعين.

ع العينات Sample Collection

يكون عزل الفيروس أفضل من الطيور التي بها أعراض عصبية مبكرة للمرض ولم تصاب لأكثر من ٢ أو ٣ أيام. تجمع الأمخاخ بشكل معقم من عدة طيور وتحفظ عند —٢٠ °م أو أقل حتى تجهز للحقن. تطحن أنسجة المخ مع شوربة مغذية تضاف لعمل معلق ١٠٪ - ٢٥٪ ثم تطرد مركزياً عند ١٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق ويجمع الرائق ويضاف إليه البنسللين (١٠٠٠٠ وحدة دولية لكل ملليتر) وستربتوميسين (١٠٠ ميكروجرام لكل ملليتر) لمنع نمو أي بكتيريا ملوثة.

أوساط الزرع ا فضلة Preferred Culture Media and Substrates

عزل الف وس با قن داخل ا خ صيصان عمر يوم

Virus Isolation by Intracerebral Inoculation of 1-Day-Old Chicks

تحقن الصيصان القابلة للإصابة عند عمر يوم في المخ بواسطة إبرة مقاس ٢٢ أو ٢٣ بكمية ٠,٠٢٥ — ٠,٠٣ مل من المعلق. تجمع أمخاخ الصوص الذي يُظهر أعراضاً إكلينيكية في خلال ١ — ٤ أسابيع عقب الحقن ويستعمل للتمرير المتسلسل في صيصان قابلة.

عزل الف وس قن كيس ا ح لأجنة بيض الدجاج

Virus Isolation by Yolk Sac Inoculation of Embryonating Chicken Eggs

يجب أن تكون الأجنة المستخدمة من قطيع قابل للإصابة بفيروس التهاب المخ الطيري. يستخدم أجنة بيض عمر ٥ — ٦ أيام للعزل والإكثار. يجب أن يكون البيض خالياً من المرضات النوعية و خالياً من فيروس سيلو CELO لتجنب تشابه الآفات بين الإصابة بفيروس التهاب المخ الطيري وفيروس سيلو في أجنة الدجاج والصوص الفاقس. يمكن تفريق فيروس سيلو من فيروس التهاب المخ الطيري باختبارات التعادل مع مضادات الأمصال النوعية. لعزل الفيروس، يحقن ٠,٢ — ٠,٥ مل من المعلق المحضر سابقاً في كيس المح لعدد ٢٤ أجنة بيض عمرها ستة أيام. يفحص ١٢ جنيناً لوجود الآفات عند ١٢ يوماً بعد الحقن. تتكون الآفات التشريحية في عدم حركة الجنين (الشلل) وضمور عضلات الرجل وأحياناً موت الجنين. في حالة عدم وجود آفات، يسمح بتفقيس الـ ١٢ بيضة الأخرى وتلاحظ الصيصان لوجود الأعراض المرضية لمدة ١٠ أيام بعد الفقس. Butterfield *et al.* (3) سجلوا أن متوسط ١٢ تمريرة ضرورياً لأقلمة ١٩ معزولة حقلية لفيروس التهاب المخ الطيري لإنتاج آفات في أجنة الدجاج. تستخدم أيضاً أجنة البيض للتمرير المتسلسل لمعزولات الفيروس المقررة لمعايرة الفيروس واختبارات التعادل للأمصال الحقلية مع عترة فيروس التهاب المخ الطيري (فان روكيل) المتأقلمة على الجنين (5 ,18).

مزرعة ا لية Cell Culture

غير عملية لأنه لا يلاحظ تأثير خلوي مرضي عليها.

تعريف ا سبب Agent Identification

هو فيروس آر إن إيه من عائلة بيكورنا جنس الفيروس المعوى (3). لا يتأثر معيار فيروس التهاب المخ الطيري بالمعاملة بالإيثير أو الكلوروفورم (3). جزيئات فيروس التهاب المخ الطيري كروية بقطر يتراوح من ١٦,٥ حتى ٢٥ نانوميتر (3).

اختبار التألق ا ناعي Fluorescent Antibody (FA) Test

هو اختبار ناجح في إظهار الأنتيجين الفيروسي لفيروس التهاب المخ الطيري في الأنسجة من الدجاج المصاب (1, 14, 17). القطاعات المجمدة ذات سمك ٦ — ٧ ميكرو من المخ والبنكرياس، والمعدة الغدية وعند الحاجة القلب، والقانصة والحبل الشوكي عند درجة حرارة —١٥ حتى —٢٠ °م باستخدام مركبات تعليق مناسبة. توضع القطاعات على الشرائح وتجفف في الهواء وتثبت في أسيتون بارد لمدة ١٠ دقائق ثم تجفف في الهواء ثانية. تفاعل

القطاعات مع مضادات الأمصال النوعية لفيروس التهاب المخ الطيري المقترنة لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة الغرفة في جو رطب، بعد ذلك تغسل الشرائح لمدة ٢٠ دقيقة في محلول ملح فوسفات عند درجة أس هيدروجيني ٧,٤، ثم تعلق الأغطية بواسطة أجزاء متساوية من محلول ملح فسيولوجي وجلسرول منظم عند درجة بي إتش ٧,٤. يمكن عند ذلك أن تفحص الشرائح تحت المجهر الفلورسيني.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

تستخدم اختبارات مصلية مختلفة لتأكيد الإصابة والتشخيص.

اختبار تعادل الف وس Virus-Neutralization Test

تختبر الأمصال من الطيور المشتبهة للأجسام المضادة المعادلة للفيروس باستخدام عترة فان روكيل والطريقة المشروحة في الفصل السادس والأربعون على الطرق المصلية. يستخدم في الاختبار أجنة بيض عمر ستة أيام قابلة للإصابة. تحقن خمس بيضات بكل تخفيف عن طريق كيس المح. يفحص البيض ١٢ يوماً بعد الحقن للآفات النمطية لمرض التهاب المخ الطيري لتحديد نقطة نهاية المعايرة. الأمصال من الدجاج المعرض للمرض عادة له لو$_{10}$ معامل تعادل ١,٥ — ٣.

اختبار قابلية ا ن للإصابة Embryo Susceptibility Test

طور هذا الاختبار لتحديد القابلية للإصابة بالمرض أوالحالة المناعية لقطيع الأمهات (15 ,16). لإجراء الاختبار، تستخدم ٣٦ بيضة تفريخ، وبعد ستة أيام من التحضين يفحص البيض ويحقن البيض المخصب عن طريق كيس المح بكمية ٠,١ مل من تخفيف 10^{-3} من المعلق المحضر من عتر فان روكيل (حوالي ١٠٠٠ متوسط جرعة معدية للجنين [EID_{50}]). استخدم .Calnek *et al* (7) جرعة أقل بواقع ١٠٠ EID_{50} لكل بيضة. عند اليوم الثاني عشر بعد الحقن، تفحص الأجنة للآفات النوعية. إذا كان كل الأجنة بها آفات، يعتبر قطيع الأمهات قابل تماماً للإصابة. إذا كان ٧٠٪ - ١٠٠٪ من الأجنة بدون آفات يعتبر قطيع الأمهات به مناعية كافية. يجب أن تسجل نسبة الأجنة بدون آفات في النتائج.

الإليزا Enzyme-Linked Immonosorbent Assay (ELISA)

يستخدم لتحديد مستوى الأجسام المضادة في مصل الدم. تتوافر أطباق الإليزا تجارياً (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.).

التفريق من العوامل ا مرضة ا شا ة Differentiation from Closely Related Agents

تباين العترة Strain Variability

كل معزولات فيروس التهاب الدماغ الطيري المسجلة وعترات اللقاح تبدو أنها متشابهة مصلياً لعترة فان روكيل وتعتبر أنها نفس النوع المصلي.

صفات عترات اللقاح Characteristics of Vaccine Strains

لقاح الف وس ا ي Live Virus Vaccine

اللقاح الأكثر استخداماً هو لقاح الفيروس الحي من العترة ١١٤٣ بواسطة Calnek *et al.* (9, 6, 4). هذه العترة هي عترة حقلية خفيفة يجب أن تحفظ عند تمرير جنيني قليل لاستخدام اللقاح (ليس أكثر من تمريرتين)، وإلا تصبح متأقلمة على الجنين وتفقد فعاليتها للتعاطي عن طريق الفم. العمر المفضل للتحصين بين ١٤ و١٨ أسبوعاً، على الأقل ٤ أسابيع قبل بداية وضع البيض. التطبيق من خلال ماء الشرب. يجب أن يكون معيار الفيروس الأدنى لعترة ١١٤٣ هو $١٠^{٣}$ EID_{50} لكل جرعة طائر.

لأن عترة اللقاح ليست متأقلمة، فإن المعايرة تتم بعمل تخفيفات متسلسلة عشارية والحقن في الأجنة التي يجب أن تكون من قطيع قابل للإصابة وتحقن عن طريق كيس المح بكمية ٠.٢ مل لكل جنين. كضابط، وتحقن ١٠ أجنة بطريقة مشابهة بالمخفف المستخدم. يوضع البيض من كل حقنة في سلال ويسمح له بالفقس. تُعرف الصيصان الفاقسة بعلامة الجناح وتوضع في حضانة سوياً مع الضوابط للملاحظة لمدة ثلاثة أيام. يتم عمل سجل للعدد الذي يظهر الأعراض المرضية للمرض من العدد الأصلي الفاقس لكل مجموعة. يحسب متوسط الجرعة المعدية لـ ٥٠٪ بطريقة ريد ومونش Reed and Muench (13).

لقاح الف وس ا يت Killed-Virus Vaccine

اللقاح المحضر من عترة فان روكيل الميتة بواسطة بيتا بروبيو لاكتون تتوافر تجارياً (Main Biological Laboratories, Waterville, Maine) ويتم الحصول على مناعة مناسبة من اللقاح الذي به مستوى فيروس قبل الإبطال $١٠^{٦}$ EID_{50} لكل ملليتر (8, 2).

تفريق ا عزولات Differentiation of Isolates

يمكن أيضاً أن تُسبب مسببات أخرى أعراضاً مرضية مشابهة مثل فقد الحركة والشلل واختلال التوازن في الصيصان. مرض مارك يشمل شللاً مؤقتاً يمكن أن يفرق بواسطة عزل الفيروس والفحص النسيجي (10). مرض

نيوكاسيل يكن تمييزه بواسطة الفحص النسيجي (12) وعزل الفيروس مع تأكيد فيروسات باراميكسو النوع ١ والاختبارات المصلية. نقص فيتامين هـ يمكن أن يتميز بالفحص النسيجي المجهري (10).

References ا راجع

1. Braune, M. O., and R. F. Gentry. Avian encephalomyelitis virus. II. Pathogenesis in chickens. Avian Dis. 15:648-653. 1971.
2. Butterfield, W. K., R. E. Luginbuhl, C. F. Helmboldt, and F. W. Sumner. Studies on avian encephalomyelitis. III. Immunization with an inactivated virus. Avian Dis. 5:445-450. 1961.
3. Butterfield, W. K., R. E. Luginbuhl, and C. F. Helmboldt. Characterization of avian encephalomyelitis virus (an avian enterovirus). Avian Dis. 13:363-378. 1969.
4. Calnek, B. W. Oral vaccine for avian encephalomyelitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 139:1323. 1961.
5. Calnek, B. W., and J. H. Jehnich. Avian encephalomyelitis studies. Annu. Rept. Univ. Mass. Bull. No. 509-62. Mass. Agric. Exp. Sta., University of Massachusetts, Amherst, Mass. 1957.
6. Calnek, B. W., and J. H. Jehnich. Studies on avian encephalomyelitis. II. Immune responses to vaccination procedures. Avian Dis. 3:225-239. 1959.
7. Calnek, B. W., R. E. Luginbuhl, P. D. McKercher, and H. Van Roekel. Committee report on a tentative program for the control of avian encephalomyelitis. Avain Dis. 4:456. 1961.
8. Calnek, B. W., and P. J. Taylor. Studies on avian encephalomyelitis. III. Immune response to betapropiolactone inactivated virus. Avian Dis. 4:116-122. 1960.
9. Calnek, B. W., P. J. Taylor, and M. Sevoian. Studies on avian encephalomyelitis. V. Development and application of an oral vaccine. Avian Dis. 5:297-312. 1961.
10. Helmboldt, C. F. Histopathologic differentiation of diseases of the nervous system of the domestic fowl (Gallus gallus). Avian Dis. 16:229-240. 1972.
11. Jones, E. E. Epidemic tremor, an encephalomyelitis affecting young chickens. J. Expt. Med. 59:781-798. 1934.
12. Jungherr, E. L., and E. L. Minard. The pathology of experimental avian pneumoencephalitis. Am. J. Vet. Res. 5:125-134. 1944.
13. Reed, L. T., and H. Muench. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497. 1938.
14. Sato, G., M. Kamada, T. Miyamae, and S. Miura. Propagation of non-egg-adapted avian encephalomyelitis virus in chick embryo brain cell culture. Avian Dis. 15:326-333. 1971.
15. Sumner, F. W., R. E. Luginbuhl, and E. L. Jungherr. Studies on avian encephalomyelitis. II. Flock survey for embryo susceptibility to the virus. Am. J. Vet. Res. 18:720-723. 1957.
16. Taylor, J. R. E., and E. P. Schelling. The distribution of avian encephalomyelitis in North America as indicated by an immunity test. Avian Dis. 4:122-132. 1960.
17. van der Heide, L. The fluorescent antibody technique in the diagnosis of avian encephalomyelitis. Tech. Bull. No. 44. Life Sciences and Agr. Expt. Sta., University of Maine, Orono, Maine. 1970.
18. Van Roekel, H., K.I. Bullis, O. S. Flint, and M. K. Clarke. Avain Encephalomyelitis. Annu. Rept. Bull. No. 388. Mass. Agric. Exp. Sta., University of Massachusetts, Amherst, Mass. 1942.

الفصل السادس والثلاثون

الالتهاب الكبدي في البط
DUCK HEPATITIS

بيتر ر. وولكوك
Peter R. Woolcock

الملخص Summary

يمكن أن يتسبب الالتهاب الكبدي في البط بواسطة ثلاثة فيروسات مختلفة على الأقل. الأكثر شيوعاً والمنتشر دولياً هو فيروس التهاب الكبد في البط (DVH) النوع I (فيروس بيكورنا، فيروس معوي) الذي يسبب إصابة حادة وبائية، وتسبب نفوقاً عالياً في البط الصغير أقل من ستة أسابيع من العمر وغالباً أقل من ثلاثة أسابيع من العمر. لا يسبب النوع I مرضاً في البط الكبير، وسجل النوع II في المملكة المتحدة فقط ويحدث في فراخ البط اقل من ١٠ أيام حتى ستة أسابيع ويسبب تغيرات مرضية مشابهة لتلك التي تحدث نتيجة النوع I. يعتبر النوع II من الفيروسات النجمية من خلال دراسات المجهر الإلكتروني. الالتهاب الكبدي في البط النوع III سجل فقط في الولايات المتحدة ويسبب آفات الكبد في البط الصغير لكنه أقل ضراوة من الالتهاب الكبدي في البط النوع I. يعتقد أن النوع III من فيروسات بيكورنا ولا يرتبط مصلياً مع فيروس النوع I.

تعريف المسبب Agent Identification

يعتمد تشخيص الالتهاب الكبدي في فراخ البط على الشكل المميز للمرض في القطيع والتغيرات المرضية العينية وعزل الفيروس من البطيطات النافقة وإحداث المرض في فراخ البط المعرضة للمرض. من الممكن التفريق بين أنواع فيروس الالتهاب الكبدي في البط I و II و III على أسس الملاحظات الإكلينيكية والمرضية، إلا أنه يمكن أن يجرى التمييز من استجابة البطيطات وأجنة البيض ومزارع الخلية لمعزولات الفيروس.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

الاختبارات المصلية لها قيمة قليلة في تشخيص الإصابات الحادة المسببة بأنواع الفيروس I و II و III. اختبارات تعادل المصل في البيض اُستخدمت مع كل الفيروسات الثلاثة والاختبارات خارج الجسم قد تطورت لفيروس النوع I. اُستخدمت هذه الاختبارات لاختبار الاستجابة المناعية للتحصين والرصد الوبائي وأيضاً للتعرف على الفيروس.

مقدمة Introduction

أنواع فيروسات التهاب الكبد في البط I و II و III هي المسبب للإصابات الفيروسية الحادة سريعة الانتشار المميتة في البط الصغير، وتتميز أساساً بالالتهاب الكبدي. أدرك التهاب الكبد في البط الأنواع II و III كمسبب للالتهاب المعوي منفصلة لأنها تحدث التهاب كبدي في فراخ البط التي لديها مناعة ضد النوع I من فيروس التهاب الكبد. البط هو العائل الطبيعي المعروف لأنواع الفيروسات الثلاثة، وهذه الأمراض ليس لها أهمية على الصحة العامة. الأمراض لها أهمية اقتصادية لكل مربي البط لأنها تحدث نفوقاً عالياً إذا لم تقاوم.

أنواع فيروس التهاب الكبد دي في إتش I و II و III يجب أن لا تتداخل مع فيروس التهاب الكبد B، وفيروس هيباندا المصنف في نفس المجموعة كفيروس الالتهاب الكبدي B للثدييات. يبدو أن هذا الفيروس له أهمية قليلة لإنتاج البط التجاري (4 ,9).

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

ف وس الالتهاب الكبدي النوع I Duck Hepatitis Virus Type I

النوع I لفيروس التهاب الكبد يصيب فراخ البط أقل من ستة أسابيع في العمر ويسبب الشكل الشائع للالتهاب الكبدي في البط. يتصف المرض بالحدوث المفاجئ والانتشار السريع وتظهر الأعراض على فراخ البط على شكل خمول وشلل وفقد التوازن، وتسقط على الجوانب وترفس الأرجل بتشنج قبل النفوق، الذي قد يحدث في أقل من ٢١ ساعة عقب ظهور الأعراض. عند النفوق، يكون الرأس مسحوباً للخلف في وضع الجنين. عملياً كل النفوق في القطيع يحدث في خلال ٣ – ٤ أيام، مع غالبية النفوق في اليوم الثاني. التغيرات المرضية العينية تظهر ابتداءً في الكبد الذي يصبح متضخم مع أنزفة واضحة على شكل نقط أو بقع. قد يشاهد أيضاً تضخم الطحال والكليتين مع بعض الاحتقان للأوعية الدموية الكلوية (13).

ڤ وس الالتهاب الكبدي النوع II Duck Hepatitis Virus Type II

يحدث هذا النوع أعراضاً وآفات تشريحية مشابهة للنوع I في بط التسمين حتى عمر ستة أسابيع. تم عزله فقط في المملكة المتحدة (5). قد تظهر الطيور المصابة أعراض صعوبة البلع وإسهال مائي وكثرة إخراج أملاح حمض البوليك. تموت الطيور المصابة عادة خلال ١ — ٢ ساعة عقب بدء ظهور الأعراض. التغيرات المرضية التشريحية تشابه تلك التي تحدث في النوع I لكن الطحالات المتضخمة قد يكون بها بؤر شاحبة مبعثرة. الجهاز المعوي يكون غالباً فارغاً على الرغم أن الأمعاء الصغيرة قد تحتوي على مخاط ومناطق نزفية على جدار الأمعاء. قد تشاهد أنزفة نقطية أحياناً على القلب (6, 5).

ڤ وس الالتهاب الكبدي النوع III Duck Hepatitis Virus Type III

يسبب أعراضاً وآفات في البط الصغير مشابهة لتلك في النوع I (1). سجل هذا النوع فقط في الولايات المتحدة حيث وصلت الخسائر حتى ٢٠٪ في البط الصغير المحصن ضد النوع I من فيروس التهاب الكبد في البط (6).

ع العينات Sample Collection

في البط المصاب، يحدث وجود للفيروس في الدم قبل أن تصبح الأعراض الإكلينيكية ظاهرة. يمكن عزل الفيروس من أي عضو حيوي والدم والزرق. لأن الكبد هو العضو المستهدف فإنه يمكن عزل الفيروس بواسطة طحن أنسجة الكبد كمعلق ٢٠٪ (وزن/حجم) في محلول الملح. ينقى المعلق بالطرد المركزي عند سرعة قليلة.

أوساط الزرع ا فضلة Preferred Culture Media and Substrates

ڤ وس التهاب الكبد النوع I Duck Hepatitis Virus Type I

يمكن تأكيد وجود فيروس التهاب الكبد بواحدة أو أكثر من الطرق التالية:

١) حقن المعزولة تحت الجلد أو في العضل في بط عمر ١ — ٧ أيام قابل للإصابة بفيروس التهاب الكبد. هذه هي أفضل الطرق كفاية وحساسية، ويجب أن يعقب الحقن الأعراض الإكلينيكية المميزة للمرض مع النفوق خلال ٢٤ ساعة من الحقن. يجب أن تظهر آفات تشريحية مصاحبة لفيروس النوع I كما يجب عزل الفيروس من الكبد لتأكيد التشخيص.

٢) حقن تخفيفات متسلسلة من كبد متجانس في الكيس السقائي لأجنة بيض البط (عمر ١٠ — ١٤ يوماً) مأخوذة من قطيع خالي من النوع I أو أجنة بيض الدجاج (عمر ٨ — ١٠ أيام). يجب أن تموت أجنة البط المصاب بالنوع I خلال ٢٤ — ٧٢ ساعة، وأجنة الدجاج تختلف كثيراً في استجابتها وعادة تأخذ ٥ — ٨ أيام

لتنفق. السوائل السقائية تكون صفراء مخضرة شاحبة. التغيرات التشريحية في الجنين تشمل التقزم وأنزفة تحت الجلد فوق كل الجسم وأوديما خاصة مناطق البطن والأرجل الخلفية. أكباد الجنين قد تكون متضخمة حمراء إلى صفراء اللون وبها بعض البؤر النخرية. آفات الكبد والتقزم تصبح أكثر وضوحاً في الأجنة التي تأخذ وقت أطول لتنفق.

٣) حقن المزارع الأولية لخلايا كبد أجنة البط (11) بالتخفيفات المتسلسلة لمتجانس الكبد المحتوي على فيروس التهاب الكبد النوع I الذي يسبب تأثيراً مرضياً خلوياً يتصف باستدارة الخلية والنخر. يجب أن تغسل الخلايا وحيدة الطبقة عند وقت العدوى لتكون خالية من الأمصال الثديية التي تثبط ادمصاص الفيروس (3). عندما تغطى المزارع لوسط الحفظ المحتوي على ١٪ آجاروز (وزن/حجم)، يظهر التأثير المرضي الخلوي على شكل بقع، وحجم البقع يمكن أن يتم السيطرة عليه بواسطة إضافة ٠,١٪ - ٠,٢٪ مصل أجنة العجول إلى الوسط. تظهر البقع بعد ٧٢ - ٩٦ ساعة من التحضين.

فـ وس التهاب كبد البط النوع II Duck Hepatitis Virus Type II

يمكن تأكيد وجود الفيروس بإحدى الطرق التالية:

١) حقن فراخ البط القابلة للإصابة عمر ١ — ٧ أيام تحت الجلد أو في العضل. قد يحدث معدل نفوق حتى ٢٠٪ خلال ٢ — ٤ يوم لكن الاستجابة متفاوتة. تشبه الآفات المرضية تلك الملحوظة في الحالات الحقلية (5).

٢) الحقن في أجنة بيض البط أو الدجاج عن طريق إما التجويف الأميني أو كيس المح. عادة لا يحدث موتاً للأجنة خلال المراحل المبكرة لكن قد يحدث بعض النفوق وتحدث الآفات المرضة بعد أربعة تمريرات. تأخذ الأجنة ٦ — ١٠ ايام لتظهر دلائل الإصابة، وعند حدوث ذلك تكون الأجنة متقزمة وبها كبد أخضر متنخر (6).

فـ وس التهاب كبد البط النوع III Duck Hepatitis Virus Type III

يمكن تأكيد وجود الفيروس بإحدى الطرق التالية:

١) الحقن في العضل ويفضل الحقن الوريدي لمعلق الكبد في فراخ البط عمر يوم. قد يصل النفوق ٢٠٪ مع معدل إصابة ٦٠٪. لا يحدث نفوق في أول ٢٤ ساعة وكل الخسائر النوعية للفيروس تحدث بين الأيام الثاني والرابع عقب الحقن.

٢) يحقن المعلق إلى الغشاء الكوريوالإنتويس لأجنة بيض البط عند عمر ١٠ أيام. الاستجابة تكون غير منتظمة، لكن بعض نفوق الأجنة عادة يحدث خلال ٧ — ١٠ أيام. الأغشية المصابة لها مظهر جاف قشري وتحتها

أوديما. الأجنة قد تكون متفرقة وبها أوديما مع أنزفة تحت الجلد. الكبد والكلى والطحال تصبح متضخمة. محاولة زرع الفيروس في أجنة بيض الدجاج أظهرت عدم نجاحها.

تعريف ا سبب Agent Identification

الشكل ا ورفولوجي Morphology

كل أنواع فيروس التهاب الكبد عبارة عن فيروسات صغيرة غير مغلفة تحتوي على الحمض النووي آر إن إيه. تم تقسيم النوع I في عائلة فيروسات بيكورنا من الفيروسات المعوية. سجل حجم جزيء الفيروس متراوحاً بين ٢٠ — ٤٠ نانوميكرون في القطر (13). النوع II له شكل الفيروس النجمي وقطره ٢٨ — ٣٠ نانوميكرون (6). النوع III يعتقد أنه فيروس بيكورنا لا ينتمي إلى فيروس التهاب الكبد النوع I وله حجم تقريباً ٣٠ نانوميكرون في القطر (8).

الصفات الفيزيوكيميائية Physicochemical Properties

تقاوم كل أنواع فيروس التهاب الكبد الثلاثة درجة الأس الهيدروجيني ٣ والتربسين ومذيبات الدهون (مثل الكلوروفورم). مقاومة الكلولورفورم لها ميزة حيث أنها تسمح بتنقية الفيروسات المعدية بينما تزيل المحتوى الدهني العالي لعينات كبد البط. لا يعمل الكلوروفورم فقط كمذيب دهون لكن أيضاً كمرسب للبروتين.

ف وس التهاب الكبد النوع I Duck Hepatitis Virus Type I

هو فيروس ثابت عند ٥٠ °م لمدة ٦٠ دقيقة، ولا يتكاثر بالكاتيونات الثنائية (ماغنسيوم$^{2+}$) (IM Mg^{+2}). الفيروس عالي الثبات تحت الظروف البيئية المضادة ويمكن أن يقتل بتركيز ١٪ فورمالدهايد و٢٪ صودا كاوية في ساعتين و٢٪ هيبوكلوريت الكالسيوم في ٣ ساعات وكلورامين في ٥ ساعات و٠,٢٪ فورمالين في ساعتين و٥٪ فينول ويسكوداين غير المخفف (محلول يود عضوي .Penetone/West, Tenafly, N.J) وكلوروكس غير المخفف (هيبوكلوريت الصوديوم، .Clorox Company, Oakland, Calif) (13).

ف وس التهاب الكبد النوع II Duck Hepatitis Virus Type II

ثابت عند ٥٠ °م لمدة ساعة. يزيل التبخير بالفورمالدهايد وطرق التطهير القياسية العدوى من العنابر الملوثة (5).

ف وس التهاب الكبد النوع III Duck Hepatitis Virus Type III

يمكن أن يثبط تماماً عند ٥٠ °م بغض النظر عن وجود كلوريد الماغنسيوم.

ا واص البيولوجية Biological Properties

تفتقد الأنواع الثلاثة القدرة على إحداث تلازن لكرات الدم الحمراء من الطيور أو الثدييات.

تباين العترة Strain Variability

ف وس التـهاب الكبـد النـوع I Duck Hepatitis Virus Type I: يرجع عادة أنه التهاب كبد البط الكلاسيكي وهو عالي الثبات وراثياً. سجلت فيروسات تتميز مصلياً من النوع I من الهند ومصر لكن علاقتها لأنواع فيروسات التهاب كبد البط الأخرى غير معروفة. المغايرة المصلية الظاهرة بارنهاردت Barnhardt عزلت من مزرعة في الولايات المتحدة وأظهرت تعادلاً تصالبياً جزئياً مع فيروس التهاب الكبد النوع I (10, 1).

ف وس التهاب الكبد النوع II Duck Hepatitis Virus Type II: في الأصل اُعتقد أنه مغاير من النوع I ويتميز مصلياً والآن اُعتبر أنه فيروس منفصل وسمي الفيروس النجمي. تم عزله فقط من فراخ البط في المملكة المتحدة ولم تعزل مغايرات مصلية من النوع II.

ف وس التهاب الكبد النـوع III Duck Hepatitis Virus Type III: سجل فقط في الولايات المتحدة. لا يوجد تفاعل تصالبي مصلي مع الأنواع I وII. بالرغم أن فيروس النوع III تم عزله من أكثر من منطقة جغرافية في الولايات المتحدة، إلا أنه لم تسجل أي مغايرات منه.

خصائص عترات اللقاح Characteristics of Vaccine Strains

ف وس التهاب الكبد النـوع I Duck Hepatitis Virus Type I: لقاح فيروس حي يحتوي على فيروس التهاب الكبد النوع I، وهو للاستخدام في أمهات البط والبط الصغير القابل للإصابة، وينتج من النوع I المضعف بعد تمريره أكثر من ٨٠ مرة في أجنة بيض الدجاج. عترة اللقاح مميتة لأجنة الدجاج عمر ٨ — ١٠ أيام مسببة نفوقاً ووفيات في خلال ٤٨ — ٧٢ ساعة من الحقن. تشمل الآفات في الأجنة النافقة تقزم ونزف تحت الجلد وأوديما وأنزفة في الكبد والكلى وأحياناً تغبر لوني أخضر في الكبد. لا يمكن أن يفرق فيروس اللقاح من الفيروس الضاري على أسس أنواع الآفات الناتجة في أجنة الدجاج، ولكن الوقت المأخوذ لتطور الآفات في الأجنة يكون عادة أقصر مع فيروس اللقاح عن الفيروس الضاري للبط الصغير. وصف أيضاً لقاح ميت لفيروس التهاب الكبد النوع I (12). كلٌّ من اللقاحات الحية والميتة لفيروس النوع I مرخصة للاستخدام في الولايات المتحدة.

ف وس التهاب الكبد النوع II Duck Hepatitis Virus Type II: أُستخدم لقاح الفيروس المضعف الحي تجريبياً تحت ظروف الحقل لحماية البط الصغير (5). نشأ فيروس اللقاح من معزولة حقلية وأُضعف بالتمرير المتسلسل ٢٥ مرة في أجنة بيض الدجاج (6). هذا اللقاح التجريبي الذي طور في المملكة المتحدة لم يرخص للاستخدام في الولايات المتحدة.

ف وس التهاب الكبد النـوع III Duck Hepatitis Virus Type III: لقاح حي من الفيروس النوع III أُستخدم في أمهات البط لإعطاء مناعة أمية في البط حديث الفقس. اللقاح محضر من فيروس تم إضعافه بالتمرير المتسلسل ٣٠ مرة في أجنة بيض البط ولا زال تجريبياً ولم يرخص في الوقت الحاضر للاستخدام في الولايات المتحدة.

تفريق معزولات ف وس التهاب كبد البط Differentiation of DHV Isolates

فيروس النوع I عادة يحدث سير مرض فوق حاد ونفوقاً حتى ١٠٠٪ في خلال ٢ – ٣ أيام من بداية الأعراض ويكون غير شائع. الحدوث المفاجئ والانتشار السريع وسير المرض الحاد لهذا المرض يكون مميزاً. الآفات النزفية في كبد البط الصغير أقل من ثلاثة أسابيع من العمر عملياً غير مميزة مرضياً. النوع III من فيروس التهاب الكبد نادراً ما يسبب نفوقاً فوق ٢٠٪. النفوق المسبب بواسطة النوع II يتراوح بين ١٠٪ و٥٠٪. فيروس النوع I هو النوع الوحيد الذى يحدث تأثيراً مرضياً خلوياً في خلايا كبد جنين البط. يتميز النوع II بشكله المحدد بواسطة الصبغ السلبي بالمجهر الإلكتروني. النوع III هو الوحيد الذي يسبب جفافاً وزيادة في سمك الغشاء الكوريوالإنتويس في أجنة بيض البط. عند حدوث الإصابة المختلطة بفيروسات النوع I أو النوع II أو النوع III، يجب استخدام طرق غير تقنيات الزرع لأن فيروس النوع I أكثر ضراوة ويغلب على أنواع الفيروسات الأخرى في تعبيره.

كشف الأنتج Antigen Detection

ف وس التهاب كبد النوع I Duck Hepatitis Virus Type I

يستخدم العديد من الاختبارات المصلية لتعريف الفيروس:

١) يتم التحصين المنفعل لفراخ البط عمر ١ – ٧ أيام قابلة للإصابة بفيروس التهاب الكبد النوع I تحت الجلد بكمية ١ – ٢ مل من مصل نوعي فائق المناعة أو أجسام مضادة نوعية من صفار البيض وبعد ذلك تعدى بالحقن في العضل أو تحت الجلد بعد ٢٤ ساعة بكمية ٠,٢ مل من معزولة ابفيروس (المعيار غير محدد). يتم إعداد مجموعة ضابطة من البط غير المحقون بالمصل بطريقة مشابهة. يبنى تعريف الفيروس على ٨٠٪ - ١٠٠٪ حماية في البط الصغير التي بها منفعلة و٨٠٪ - ١٠٠٪ نفوق في المجموعة الضابطة.

٢) يعدى بالحقن في العضل أو تحت الجلد فراخ البط عمر ١ — ٧ أيام قابلة للإصابة ومحصنة أمياً ضد فيروس التهاب الكبد النوع I بحقن ٠,٢ مل من معزولة الفيروس (المعيار غير محدد). يبنى التعرف على فقدان ٨٠٪ - ١٠٠٪ في البط القابل للإصابة و٨٠٪ - ١٠٠٪ حماية في البطيطات التي بها مناعة أمية.

٣) تخلط تخفيفات متسلسلة عشارية من معزولة الفيروس مع أحجام مساوية من مصل فائق المناعة نوعي ضد فيروس النوع I مخففة ١ : ٥ أو ١ : ١٠. يترك الخليط ليتفاعل عند ٣٧° م أو درجة الغرفة لمدة ساعة ويحقن بعد ذلك في فراخ البط القابل للإصابة (٠,٢ مل تحت الجلد)، وفي التجويف السقائي لأجنة بيض البط (٠,٢ مل)، وفي خلايا كبد أجنة البط الابتدائية وحيدة الطبقة (3 ,11). تتكون المجموعات الضابطة في كل حالة من معزولة الفيروس مخلوطة مع مصل ضابط عادي.

فـ وس التهاب كبد البط النوع II Duck Hepatitis Virus Type II

لم توظف التقنيات المصلية روتينياً بسبب ضعف الاستجابة المناعية للإصابة في كلٍّ من البط الصغير وأجنة البط، إلا أن اختبار التعادل اُستخدم لتعريف الفيروس. تحقن أجنة الدجاج عن طريق تجويف الكيس السقائي بمخلوطات المصل الثابت-الفيروس المتغير (5). تجرى اختبارات الحماية التصالبية في بط صغير عمر ٢ — ٤ أيام، وتحقن هذه بمضادات الأمصال للأنواع I و II ثم تعدى بعد ثلاثة أيام بمعزولة الفيروس (5). فيروس النوع II يمكن أن يكتشف بالمجهر الإلكتروني سالب الصبغة لتحضيرات من الكبد والزرق ويكون له شكل شبيه الفيروس النجمي (5 ,6).

فـ وس التهاب كبد البط النوع III Duck Hepatitis Virus Type III

الحدوث الأقل للنفوق (حد أقصى ٢٠٪) في فراخ البط المصابة تجريبياً بفيروس النوع III يجعل اختبارات تعادل الفيروس في العائل صعباً. اختبار تعادل الفيروس باستخدام طريقة المصل الثابت الفيروس المتغير يكون ممكناً في أجنة بيض البط المحقون بطريقة الغشاء الكوريوالإنتويس الساقط. لم تنجح محاولات إحداث تأثير مرضي خلوي بالفيروس في مزارع الخلية، على الرغم أن الفيروس يمكن اكتشافه باختبار التألق المناعي المباشر في مزارع الخلية لكبد أجنة البط وكلى أجنة البط المصابة تجريبياً (DEK) (8).

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

اُستخدمت الأنواع الثلاثة في اختبارات تعادل الفيروس في البيض، لكن نجاحها يعتمد على تغيير الفيروس في نظام الاختبار المستخدم، مع فيروسات النوع II و III هذه تكون مشكلة. طورت الاختبارات خارج العائل لفيروس النوع I، وتشمل هذه اختبار تناقص البقع والمعايرة الدقيقة (11 ,12). قد يجرى اختبار تناقص البقع

باستخدام أيٍّ من خلايا كبد أو كلى أجنة البط الأولية. تجهز الخلايا الأولية في وسط EMEM المحتوية على ٥٪ - ١٠٪ مصل أجنة العجول، و٢ ملليمول جلوتامين، و٠,١٧ بيكربونات صوديوم وجنتاميسين. تبذر الخلايا المعاملة بالتربسين في أطباق بترى ٥ سم وتحضن عند ٣٧°م في ٥٪ ثاني أكسيد الكربون. يجب أن تتكون الطبقة عند ٢٤ – ٤٨ ساعة بعد وضعها ثم تغسل مرتين بمحلول ملح EMEM أو Hank الخالي من المصل لإزالة كل بقايا مصل أجنة العجول قبل العدوى بالفيروس النوع I.

تعلق أحجام متساوية من فيروس النوع I في EMEM خالي من المصل، وتضبط حتى ٢٠٠ وحدة تكوين بقع لكل ٠,١ مل وتخلط مع أحجام متساوية من أمصال بط مخففة تسلسلياً (تخفيفات مزدوجة أو ثنائية في EMEM). يجب أن تثبط عينات المصل عند ٥٦°م لمدة ٣٠ دقيقة قبل الاختبار. يحضن خليط الفيروس والمصل عند ٣٧°م لمدة ساعة، عند ذلك تضاف كميات من ٠,١ مل إلى الخلايا المندمجة وحيدة الطبقة بواقع ثلاثة أطباق لكل تخفيف. تترك الأطباق لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة الغرفة (٢٠ – ٢٢°م)، ثم تغطى بالآجاروز [EMEM المحتوي على ٢٪ مصل دجاج و٠,١٪ - ٠,٢٪ مصل أجنة العجول مضاف إليها آجاروز بتركيز نهائي ١٪ (وزن/حجم)]. توضع الأطباق عندئذ عند ٣٧°م في جو ٥٪ من ثاني أكسيد الكربون. يسجل عدد البقع الناتجة بعد ٤٨ ساعة من التحضين. قد تلاحظ البقع باستخدام مصدر إضاءة مائل أو بدلاً من ذلك تثبت الطبقة الواحدة بالفورمالين مع محلول الملح ١٠٪ وتصبغ بالكريستال فيوليت ١٪. معيار الأجسام المضادة في المصل يعبر عنه بمقلوب أعلى تخفيف المصل الذي يخفض عدد البقع بواقع ٥٠٪.

قد يجرى اختبار التعادل الدقيق باستخدام خلايا كلى أجنة البط. يجهز كالسابق تخفيفات ثنائية متسلسلة من كل عينة مصل في ٥٠ ميكروليتر من الوسط الأساسي الخالي من المصل، وEagle (BME) في أطباق المعايرة الدقيقة. تضاف تقريباً ١٠^{٢} متوسط جرعة مؤثرة على مزرعة الخلية من فيروس النوع I في ٥٠ ميكروليتر من BME المزود بشوربة فوسفات التربتوز ١٠٪، و٢ ملليمول جلوتامين، و٠,١٧٪ بيكربونات الصوديوم، و٢٪ - ٤٪ مصل دجاج وتضبط لتحتوي على ٣ x ١٠^{٥} خلية لكل ملليتر. تضاف الخلايا إلى الأطباق بمعدل ١٠٠ ميكروليتر لكل حفرة وتحضن الأطباق حتى ٩٦ ساعة عند ٣٧°م في جو رطب به ٥٪ من ثاني أكسيد الكربون. عقب التحضين تثبت الخلايا كما شرح سابقاً وتقرأ الأطباق بالعين. معيار نشاط تعادل الفيروس بمقلوب أعلى تخفيف من المصل الذي عنده تنمو الطبقة الواحدة التي ليس بها دليل تأثير مرضي خلوي ومن ثم يحدث التعادل الكامل للفيروس. يعتبر المعيار أقل من ٤ لو$_{٢}$ سالباً. اختبارات التعادل تستخدم لمعايرة استجابة المناعة الجزيئية للتحصين وللمسح الوبائي وأيضاً لتعريف الفيروس.

التفريق من العوامل ا مرضة ا شا ة Differentiation from Closely Related Agents

لا تسبب معظم الممرضات الفيروسية غير التهاب كبد البط الفيروسي مرضاً في البط أقل من ستة أسابيع من العمر، وتقاوم كل الأنواع الثلاثة لفيروس التهاب الكبد الكلورفورم الذي يقتل معظم الممرضات الفيروسية الأخرى، على سبيل المثال التهاب الأمعاء الفيروسي في البط، وفيروس مرض نيوكاسيل، وفيروس إنفلونزا الطيور. يمكن أن تمثل وبائيات المرض المسببة بالمغايرات المصلية للأنواع I و II و III مشكلة في تحديد المسبب، خاصة عندما يوجد فيروس النوع I الكلاسيكي المضعف نتيجة للتحصين. سجلت إصابات مزدوجة من النوع I والمتدثرة الببغائية (2) وفيروس إنفلونزا (7). تم تسجيل مسببات أخرى للنفوق الحاد في البط الصغير تشمل الإصابة بالسالمونيلا وسموم أفلاتوكسين. المرض الأخير قد يسبب شللاً وتشنجات والتواء الرأس للخلف وآفات مجهرية في الكبد التي تقترح التهاب الكبد لكن السموم الفطرية لا تسبب أنزفة متميزة في الكبد.

ا راجع References

1. Calnek, B. W. Duck virus hepatitis. In: Virus infections of birds. J. B. McFerran and M. S. McNulty, eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 485-495. 1993.
2. Chalmers, W. S. K., H. Farmer, and P. R. Woolcock. Duck hepatitis virus and Chlamydia psitacioutbreak. Vet. Rec. 116:223. 1985.
3. Chalmers, W. S. K., and P. R. Woolcock. The effect of animal sera on duck hepatitis virus. Avian Pathol. 13:727-732. 1984.
4. Fernholz, D., K. Wetz, and H. Will. Hepatitis B viruses in birds. In: Virus infections of birds. J. B. McFerran and M. S. McNulty, eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands. pp. 111-119. 1993.
5. Gough, R. E., E. D. Borland, I. F. Keymer, and J. C. Stuart. An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. Avian Pathol. 14:227-236. 1985.
6. Gough, R. E., and J. C. D. Stuart. Astroviruses in ducks (duck virus hepatitis type II). In: Virus infections of birds. J. B. McFerran and M. S. McNulty, eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands. pp. 505-508. 1993.
7. Gough, R. E., and A. S. Wallis. Duck hepatitis type I and influenza in mallard ducks. Vet. Rec. 119:602-603. 1986.
8. Haider, S. A., and B. W. Calnek. In vitro isolation, propagation and characterization of duck hepatitis virus type III. Avian Dis. 23:715-729. 1979.
9. Mason, R. A., G. Seal, and J. Summers. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. J. Virol. 36:829-836. 1980.
10. Sandhu, T. S., B. W. Calnek, and L. Zeman. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus. Avian Dis. 36:932-936. 1992.
11. Woolcock, P. R. An assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cells and a comparison with other assays. Avian Pathol. 15:75-82. 1986.
12. Woolcock, P. R. Duck hepatitis virus type I: studies with inactivated vaccines in breeder ducks. Avian Pathol. 20:509-522. 1991.
13. Woolcock, P. R., and J. Fabricant. Duck virus hepatitis. In: Diseases of poultry, 9th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, and H. W. Yoder, Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 597-608. 1991.

التهاب الكبد الفيروسي في الرومي
TURKEY VIRUS HEPATITIS

ويلي م. ريد
Willie M. Reed

ا لخص Summary

هو مرض عالي الوبائية، وغالباً تحت إكلينيكي في صغار الرومي الأقل من خمسة أسابيع في العمر. الحدوث الحقيقي للإصابة غير معروفة بسبب الطبيعة الإكلينيكية للمرض ونقص الاختبارات المصلية المتاحة. يتصف المرض بالنخر الكبدي والبنكرياسي متعددة البؤر، ويصحبه بصورة متكررة خلايا التهابية تتكون غالباً من الخلايا الليمفاوية والخلايا البلعمية وأعداد أقل من هيتيروفيل. لم يوصف العامل المسبب كاملاً لكن له صفات شكلية مثل فيروس بيكورنا.

تعريف ا سبب Agent Identification

يمكن إكثار الفيروس بحقن كيس المح لأجنة بيض الدجاج عمر ٥ — ٧ أيام. يبنى التشخيص على وجود الآفات التشريحية والمجهرية النمطية في الكبد والبنكرياس في صغار الرومي المصابة وعدم عزل بكتيريا أخرى وممرضات فيروسية ونادراً بواسطة عزل الفيروس المسبب.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

الاختبارات غير متاحة.

ا قدمة Introduction

ينتج التهاب الكبد الفيروسي في الرومي من الإصابة بفيروس شبيه بفيروس بيكورنا ويحدث آفات كبدية وبنكرياسية فقط في الرومي (4, 3, 2, 1). الإصابة تحت إكلينيكية وتحدث في صغار الرومي فقط. الدجاج والسمان

والفزان والبط والفئران والأرانب مقاومة للإصابة. ليس لهذا المرض أهمية اقتصادية ومستوى عالٍ من الاشتراطات الصحية والرعاية الجيدة تحد من تأثيرات المرض. وصف أولاً في أمريكا الشمالية في عام ١٩٥٩م ويحدث في معظم، إن لم يكن في جميع مناطق، إنتاج الرومي التجاري المكثف (7, 5). سجل المرض في إيطاليا والمملكة المتحدة أيضاً (2).

ا رض الإكلينيكي والتغ ات ا رضية Clinical Disease and Pathology

يشاهد المرض عامة في الرومي فقط الأقل من خمسة أسابيع من العمر ويتميز بالنفوق المفاجئ المتراوح حتى ٢٥٪ (2)، إلا أن معدلات الإصابة قد تصل ١٠٠٪ في بعض القطعان (2). يتركز النفوق كثيراً في الفترة من ٤ — ٨ أيام. تتركز الآفات في الكبد والبنكرياس. يتضخم الكبد عامة ويحتوي على بؤر منخفضة منتشرة ومتشابكة ورمادية قد تختفي بوجود احتقان أو بؤر نزفية. الإصابة في البنكرياس تحدث غالباً على السطح الظهري وتتكون من بؤر رمادية إلى بيضاء مستديرة إلى بيضاوية. بالرغم من الاشتباه في انتقال الفيروس رأسياً اعتمد أساساً على الملاحظات الحقلية، إلا أن هذا لم يثبت.

ع العينات Sample Collection

يفضل الكبد الذي به آفات مميزة، بالرغم أن عزل الفيروس يمكن أن يتم من مختلف الأنسجة شاملة البنكرياس والطحال والكلى ومن الزرق. يفضل الطيور المبردة الكاملة الميتة، لكن تجمع بصورة معقمة وتبرد أو تجمد الأكباد التي بها الآفات واضحة.

أوساط الزرع ا فضلة Preferred Culture Media and Substrates

يحضر متجانس الأنسجة لحقن الجنين بطحنها (٥ — ١٠ أجزاء) في شوربة مغذية أو محلول ملح فوسفات وتضاف المضادات الحيوية والمضادات الفطرية ويؤخذ الرائق بعد الطرد المركزي لمدة ٢٠ دقيقة عند ١٥٠٠ إكس جي ويحقن ٠,٢ مل في كيس المح لأجنة بيض الدجاج التي عمرها ٥ — ٧ أيام. يحدث النفوق (المميز بالاحتقان الجلدي والنزيف) عادة في ٥ — ١٠ أيام عقب الحقن، لكن المعيار القليل للفيروس في الطعم قد يتطلب تمريراً ثانياً للمح الذي جمع من المرة الأولى قبل حدوث النفوق النمطي للنفوق.

أجنة الرومي حتى ١٠ أيام من العمر تناسب تنمية الفيروس لكنها ليست مفضلة كنظام زرع نتيجة احتمال وجود أجسام مضادة أمية. لم يتم تنمية وإكثار فيروس التهاب كبد الرومي في مزرعة الخلية.

Agent Identification تعريف ا سبب

لم يوصف الفيروس المسبب كاملاً لكن سجل أن له الصفات الشكلية لفيروس بيكورنا. الفيروس مقاوم للكلوروفورم والإيثير والفينول وكريولين، لكن ليس للفورمالين. يعيش الفيروس في المح لمدة ست ساعات عند ٦٠ °م، و١٤ ساعة عند ٥٦ °م، و٤ أسابيع عند ٣٧ °م. يعيش لمدة ساعة عند درجة أس هيدروجيني ٢ لكن ليس عند درجة أس هيدروجينى ١٠ (8 ,9). يمر الفيروس خلال غشاء ٠,١ نانوميكرون. الآفات في الأجنة المصابة على الرغم أنها مرجحة للمرض لكنها غير محددة وبالرغم أن وجود العينات المشخصة يسمح بالتشخيص الافتراضي القوي لكن التأكيد الإضافي يجب أن يتم بإعادة إحداث المرض. يحقن على الأقل ستة صيصان رومية عمر ١ — ٧ أيام في العضل أو تحت الجلد أو في الغشاء البريتوني بكمية ٠,٢ — ٠,٥ مل من معلق الكبد أو سوائل المح من الأجنة المصابة (6). لأنه نادراً ما تتطور أعراض مرضية، يذبح واحد أو أكثر من الصوص ويفحص يومياً بداية من الأيام ٥ — ٧ عقب الحقن. المجموعة الضابطة المقارنة المنعزلة يجب أن تفحص أيضاً لاستبعاد أي إصابة سابقة. الآفات عادة تكون أقل حدة من الإصابات الطبيعية. لا تحدث آفات أو تكاثراً فيروسياً في صوص الدجاج.

Serologic Detection in the Host الكشف ا صلي العائل

لا يوجد تطور للكشف المصلي للإصابة. المعيار المنخفض المميز للفيروس في المح عقب الحقن في الجنين بغرض الإكثار، وعادة أقل من EID_{50} ٣,٥ مما يشجع بشدة الدراسة الإضافية.

Differentiation from Closely Related Agents التفريق من العوامل ا مرضة ا شا ة

يجب أن تستبعد الإصابة البكتيرية خاصة أنواع سالمونيلا أو باستيريلا ملتوسيدا أو الإيشريكية القولونية والإصابات المسببة بالمجموعة ١ والمجموعة ٢ من فيروس أدينو الطيور وفيروس ريو وهيستوموناس ميلياجريديس.

References ا راجع

1. Andral, B., M. Lagadic, G. Bennejean, D. Toquin, and J. M. Florent. Picoma-like viruses of young turkeys: pathogenesis of a disease of poults caused by a picoma-like virus. Avian Pathol 19:245-254. 1990.
2. Guy, S. J. Turkey viral hepatitis. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 773-777, 1997.
3. Klein, P. N., A. E. Castro, C. U. Meteyer, B. Reynolds, J. A. Swartzmann-Andert, G. Cooper, R. P. Chin, and H. L. Shivaprasad. Experimental transmission of turkey viral hepatitis to day-old poults and identification of associated viral particles resembling picomaviruses. Avian Dis. 35:115-125. 1991.
4. MacDonald, J. W., C. J. Randall, and M. D. Dagless. Picoma-like virus causing hepatitis and pancreatitis in turkeys. Vet. Rec. 111:322. 1982.
5. Mongeau, J. D., R. B. Truscott, A. E. Ferguson, and M. C. Connell. Virus hepatitis in turkeys. Avian Dis. 3:388-396. 1959.

6. Snoeyenbos, G. H., and H. I. Basch. Further studies of virus hepatitis in turkeys. Avian Dis. 4:477-484. 1960.
7. Snoeyenbos, G. H., H. I. Basch, and M. Sevoian. An infectious agent producing hepatitis in turkeys. Avian Dis. 3:377-388. 1959.
8. Tzianabos, T., and G. H. Snoeyenbos. Some physicochemical properties of turkey hepatitis virus. Avian Dis. 9:152-156. 1965.
9. Tzianabos, T., and G. H. Snoeyenbos. Clinical, imunological, and serological observations on turkey virus hepatitis. Avian Dis. 9:578-591. 1965.

شكر وتقدير Acknowledgment

الشكر والامتنان لمشاركة الدكتور جلين هـ. سنيونوبس المؤلف السابق لهذا الفصل.

التهاب المفصل الفيروسي/التهاب غمد الأوتار وإصابات فيروس ريو الأخرى

VIRAL ARTHRITIS/TENOSYNOVITIS AND OTHER REOVIRUS INFECTIONS

جون ك. روزينبر غ، ونورمان أ. أولسون، ولويس فان دير هيد

John K. Rosenberg, Norman O. Olson, and Louis van der Heide

ا لمخص Summary

تصيب فيروسات عائلة ريوفيريدى *Reoviridae* جنس فيروس أورثوريو *Orthoreovirus* تصيب مختلف أنواع الطيور شاملة الدواجن. التهاب المفصل الفيروسي في الدواجن هو أكثر الظواهر المرضية لعدوى فيروس ريو للطيور. ارتبطت متلازمة عدم الامتصاص malabsorption syndrome في الدجاج التي تشمل التقزم والإسهال وهشاشة العظام وتكسير النهاية العليا لعظمة الفخذ أيضاً بإصابة فيروس ريو، إلا أنه تشترك عدة عوامل مسببة مختلفة في متلازمة عدم الامتصاص. تشترك ظروف مرضية أخرى مع إصابات فيروس ريو وتشمل التهاب الكبد والتهاب عضلة القلب والتامور المائي وإصابات الجهاز التنفسي والمعوي. العديد من إصابات فيروس ريو تحت إكلينيكية.

التهاب ا فصل الف وسي Viral Arthritis/Tenosynovitis

تعريف ا سبب Agent Identification

يعتمد التشخيص الافتراضي على الآفات شاملة التضخم المزدوج لقصبة الرجل وحزم الأوتار فوق مفصل الركبة في الدجاج والآفات في أجنة الدجاج المحقونة عند ٥ — ٧ أيام في كيس المح أو التأثير المرضي الخلوي وتكوين المدمج الخلوي في مزارع خلية كلى الدجاج. تأكيد فيروس الريو يكون من خلال إظهار الأنتيجينات النوعية في الأجنة أو سوائل المفصل أو مزارع الخلية بواسطة اختبارات الترسيب أو الانتشار المناعي أو التألق المناعي.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمكن أن تستخدم اختبارات الإليزا وتعادل الفيروس والانتشار المناعي في الآجار لدعم الإصابات السابقة، إلا أنه بسبب أن إصابات فيروس الريو يمكن أن تكون تحت إكلينيكية ومنتشرة فإن تاريخ القطيع والمعلومات الأخرى يجب أن تقيم قبل الحكم على نتائج الفحص المصلي.

ا تلازمات الأخرى Other Syndromes

تعريف ا سبب Agent Identification

أفضل ما يكون التشخيص بواسطة عزل الفيروس في الأجنة أو مزارع الخلية مع التأكيد بواسطة كشف الأنتيجينات النوعية لفيروس ريو. العدوى التجريبية لمتلازمة حقلية قد يكون ضرورياً لتحديد ما إذا كان فيروس ريو هو المسبب.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمكن أن تستخدم إختبارات إليزا وتعادل الفيروس والانتشار المناعي في الآجار لتدعيم الإصابات السابقة، إلا أنه بسبب أن إصابات فيروس ريو يمكن أن تكون تحت إكلينيكية وواسعة الانتشار فإن تاريخ القطيع والمعلومات الأخرى يجب أن تقيم قبل الحكم على نتائج الفحص المصلي.

ا قدمة Introduction

تنتشر فيروسات ريو الطيور في الدجاج والرومي وأنواع الطيور الأخرى (12, 14, 15, 16, 18, 23). عزلت فيروسات ريو الطيور من الدجاج المصاب بأحوال مرضية متنوعة تشمل التهاب المفصل الفيروسي (4, 8, 9, 12, 14, 19)، ومتلازمة التقزم (13)، والمرض التنفسي (2, 5, 11, 15)، والمرض المعوي (1, 5)، ومتلازمة عدم الامتصاص (10, 13)، وهشاشة العظام (20)، بالإضافة أنها توجد بصورة متكررة في الدجاج غير المصاب إكلينيكياً. شدة وطبيعة المرض مثل التهاب المفصل الفيروسي التي تحدث عقب إصابة فيروس ريو تعتمد على عمر العائل وضراوة الفيروس وطريقة التعرض.

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

التهاب ا فصل الف وسي Viral Arthritis/Tenosynovitis

أكثر الأمراض انتشاراً المصاحب لفيروس ريو الطيور هي التهاب المفصل الفيروسي والتهاب غمد الوتر. تشمل الأعراض الرئيسية في بدارى اللاحم التي عمرها ٤ - ٧ أسابيع هو التضخم في القصبة في الناحيتين والأوتار

فوق مفصل القدم مسبباً حركة محدودة للأوتار وعرجاً وأحياناً تمزقاً في وتر عضلة السمانة. قد يشاهد التهاب الكبد وعضلة القلب والطحال في صيصان عمر ١ - ٧ أيام.

مجهرياً، تحدث الزيادة في حجم وعدد خلايا غشاء المفصل (21). الخلايا المبطنة لغشاء المفصل ترشحت بالخلايا الليمفاوية وخلايا البلازما. الأضرار في القلب تتكون من ترشيحات بين ألياف القلب المصحوبة بمساحة بؤرية من الخلايا المشوهة. يحدث غالباً تراكم الخلايا الليمفاوية في الأوعية الدموية.

متلازمة عدم الامتصاص Malabsorption Syndrome

تصاحب إصابات فيروس الريو متلازمة عدم الامتصاص، لكن سببها المحدد يظل غير واضح، وترجع الأعراض المرضية في الدجاج عند ١ — ٣ أسابيع إلى عدم الامتصاص وتشمل ضعف تكوين الصبغة وتريشاً غير طبيعي وهشاشة العظام ونمواً غير متساوٍ وغذاء غير مهضوم في الزرق وزيادة النفوق (10 ,13 ,22). قد تشمل الآفات تضخم المعدة الغدية والتهاباً معوياً وعرجاً مصحوباً مع التهاب أغماد الأوتار. لوحظت آفات نسيجية تشمل التهاب المعدة الغدية وعضلة القلب وضموراً في بيرسا فابريسي والتهاب البنكرياس والتهاباً معوياً وضمور الخملات المعوية (10 ,13). وصف أيضاً وجود تجويف في قرص نمو العظام الفخذي مع نخر في الغضروف وتكسر في رأس عظمة الفخذ (10).

ع العينات Sample Collection

يجب جمع سوائل المفصل من مفاصل القدم والركبة بواسطة مسحات معقمة أو مستخلص ١٠٪ من أغماد الأوتار في شوربة مغذية أو وسط مزرعة الخلية. يمكن أن يؤخذ أيضاً مسحات أو متجانس نسيج من الطحال أو المجمع أو القصبة الهوائية. المراحل الهضمية والتنفسية لإصابات فيروس ريو قصيرة الفترة وتجعل عزل الفيروس من تلك الأنسجة صعباً. يمكن حفظ العينات عند —٢٠ °م حتى تستخدم.

أوساط الزرع ا فضلة Preferred Culture Media and Substrates

يمكن أن يزرع الفيروس في كيس المح أو على الغشاء الكوريوني السقائي لأجنة بيض الدجاج أو في خلايا كلى الدجاج (16). لم تُجرَ مقارنة بين الطريقتين، لكن يفضل العزل الأصلي في كيس المح.

حقن ا ـ Embryo Inoculation

يجب أن يحصل على البيض من قطيع خالي من فيروس ريو، سلبي للأجسام المضادة. الطريقة المفضلة هي حقن كيس المح في أجنة بيض الدجاج عند عمر ٥ — ٧ أيام، يحقن ٠,١ — ٠,٢ مل من المواد المشتبهة لكل بيضة.

طريق الكيس السقائي للحقن عادة غير مناسب. يمكن أن يستخدم الغشاء الكوريوالإنتويس السقائي لإظهار الآفات شبيهة البقع والاحتوائيات السيتوبلازمية. يقتل حقن كيس المح الجنين في ٣ – ٥ أيام ويكون الجنين نزفي بشكل واضح أو يتغير لونه إلى الأحمر القرمزي. تكون الأعضاء الداخلية محتقنة ونزفية. تكون الأجنة التي تعيش حتى عمر ١٧ – ٢١ يوماً متقزمة بصورة خفيفة والكبد والطحال والقلب يكون متضخماً ويحتوي على بؤر نخرية.

الحقن على الغشاء الكوريوني السقائي لأجنة البيض عمر ١٠ يوم يقتل الأجنة في ٣ – ٥ أيام وقد تتطور شبيهات البقع على الغشاء الكوريوني. يمكن رؤية الأجسام الاحتوائية في طبقة الميزوديرم استخدام صبغة هيماتوكسلين وإيوسين أو تقنية التألق المناعي.

مزرعة ا لية Cell Culture

تفضل مزرعة خلايا كلى الدجاج من صوص عمر ٢ – ٦ أسابيع على الخلايا الليفية لأجنة الدجاج لزراعة فيروسات ريو الدجاج. البيئة المناسبة هي ميم MEM أو إيجل Eagle مع محلول ملح إيرلي وجلوتامين، و١٠٪ مصل أجنة العجول وبيكربونات صوديوم (١,٥ جم/ل)، وللحفظ ٣٪ مصل عجول وبيكربونات صوديوم بمصل ١,٥ جم/ل. المضادات الحيوية المستخدمة لكل لتر من الوسط المستخدم هي ١٠٠٠٠٠ وحدة من البنسللين، و٠,١ جرام داي هيدروستربتوميسين، و٢,٥ مجم من أمفوتريسين B. يفضل استخدام حضان رطب مع ثاني أكسيد الكربون (٥٪). يتكون عقب الحقن مدمج خلوي عادة مبكراً بعد ٢٤ – ٤٨ ساعة. يطفو المدمج الخلوي حراً تاركاً ثقوب في طبقة الخلايا الواحدة. تتحد المدمجات الخلوية بالغشاء مظهرة كتلة من الخلايا الميتة مع مساحة واضحة تشبهة الهالة. كلما أصبح الفيروس متأقلماً لمزرعة الخلية، وقد يدمر غشاء الخلية الكامل في ٢٤ ساعة.

تعريف ا سبب Agent Identification

ا ورفولوجي وا واص الفيزيوكيميائية
Morphology and Physicochemical Properties

فيروسات ريو هي فيروسات آر إن إيه مزدوجة الشريط في عائلة ريو (3). لا يثبط تكاثر الفيروس في وجود مثبطات الأيض للحمض دي إن إيه، وأكتينوميسين D بمعدل ٠,٥ ميكروجرام/مل، وسيتوزين أرابينوسايد بمعدل ١٠٠ ميكروجرام/مل أو ٥-فلورو-٢ ديوكسي يوريدين بمعدل ٣٠٠ ميكروجرام/مل في مزرعة كلى أجنة الدجاج الابتدائية (21). الفيروس ثابت حرارياً ويقاوم الإيثير والكلوروفورم وبي إتش ٣ (12). تركيبياً يكون الكابسيد أشعة بلورية في سيتوبلازم الخلايا المصابة (21). يتكون الكابسيد يتكون من ٩٢ كابسوميراً.

تعريف الف وس Virus Identification

يمكن استخدام اختبار التألق المناعي المباشر أو غير المباشر ضد أنتيجين المجموعة النوعي لتعريف المسبب. يمكن أيضاً استخدام اختبارات الترسيب في الآجار وتعادل الفيروس للتعرف على الفيروس. اختبار التألق المناعي أكثر قدرة في كشف الأنتيجين في النسيج المصاب خاصة سيتوبلازم الخلايا المصابة، الزليل ومزرعة الخلية (5 ,14).

تباين عترة الف وس Virus Strain Variability

في اليابان، تم وصف خمسة أنواع مصلية من فيروسات ريو الطيور عزلت من الزرق ومسحات المجمع والقصبة الهوائية. لم تتحدد ضراوتها للأنسجة الزليلية والأوتار (5). في الولايات المتحدة تم التعرف على أربعة أنواع مصلية (15). المعزولات من الأنسجة الزليلية ظهرت أنها أنماط من نوع مصلي مفرد (16) ومحتمل أنها تشبه المعزولات الأخرى (4 ,8). بالرغم من ضرورة دراسة إمراضية فيروسات ريو الطيور أكثر، إلا أن كل المعزولات قادرة على إحداث التهاب المفصل أو التهاب الأغماد والأوتار عند الحقن في وسادة القدم في دجاج عمر أسبوعين. يمكن تفريق فيروسات ريو الطيور من الأنواع البشرية ١ و ٢ و ٣ بواسطة قدرة فيروسات ريو الطيور أن تلزن كرات الدم للإنسان النوع O وعدم مقدرة الأنواع البشرية أن تنمو في كيس المح لأجنة الدجاج. بالإضافة إلى ذلك يمكن استخدام اختبارات الترسيب في الآجار وتعادل الفيروس للتعرف على فيروسات ريو الطيور. فروق العترة المبنية على الإمراضية النسبية يمكن أن توضح مع معزولات فيروس ريو المتماثلة أو المتشابهة أنتيجينياً (13).

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمكن أن يستخدم اختبار الانتشار المناعي في الآجار لتوثيق الإصابات السابقة. يجهز الأنتيجين من الأغشية الكوريونية السقائية من الأجنة النافقة نتيجة الحقن عند ٥ — ٧ أيام بطريق كيس المح. يجهز آجار نوبل (١٪) في محلول ملح فوسفات ٠,٠١ مول عند بي إتش ٧,٢ محتوياً على ٨٪ ملح و٧,٥٪ جلايسين. الجلايسين ليس ضرورياً لكن قد يعطي تفاعلاً أكثر تميزاً. يجب أن توضع عينات المصل الإيجابي المعلوم في الحفر ١ و ٤، ومن ثم يمكن تمييز خط التماثل مع الأمصال المجهولة (14). كل فيروسات ريو (الأنواع المصلية) المعروفة تشترك في أنتيجين الترسيب النوعي للمجموعة العام. تميل الأجسام المضادة المرسبة إلى أن تبقى في الطيور التي بها إصابات مفاصل لكن قد تختفي في أربعة أسابيع في طيور عديدة، وبالتالي الاختبار الشهري يكون مرغوباً في المسح المصلي للإصابة.

أفضل ما يجرى اختبار التعادل باستخدام اختبار تناقص البقع في مزرعة خلايا كلى أجنة الدجاج. قد تستخدم تخفيفات ثنائية لمصل الدجاج. يخلط كمية متساوية من الفيروس المحتوي على ١٠٠ وحدة مكونة للبقع مع تخفيفات المصل وتحضن عند ٣٧° م لمدة ٤٥ دقيقة. يحقن كمية ٠,٢ مل في مزرعة الخلية في أطباق بتري مقاس

٦٠ x ١٥ وتترك للامتزاز لمدة ساعة مع الهز المتكرر. تشفط السوائل الزائدة وتغطى الخلايا بالوسط (٥ مل) المتكون كما وصف سابقاً ويحضن لمدة ٥ - ٧ أيام وتغطى بكمية ٢ مل من ٠,٠٠١٪ أحمر متعادل. تعد البقع في ٤ - ٨ ساعات. معيار المصل هو مقلوب أعلى تخفيف للمصل الذى يوقف ٩٠٪ من البقع. معيار المصل ٤٠ أو أكثر يعتبر معنوياً. اُستخدمت طريقة منع البقع على الغشاء الكوريوني السقائي لكن النتائج صعبة التقييم.

التفريق من العوامل ا مرضة ا شا ة Differentiation from Closely Related Agents

التهاب ا فصل/التهاب غمد الأوتار Arthritis/Tenosynovitis

يجب أن تفرق هذه الإصابة من الإصابة بالميكوبلازما سينوفي والتهاب المفصل البكتيري والعرج الناتج من التشوهات التشريحية. يمكن أن يشخص التهاب المفصل إكلينيكياً ويجب أن يؤكد التشخيص بالعزل والتعرف على الفيروس. قد يتطلب حزم الأوتار المصابة الفحص المجهري لإظهار الآفات (6). يؤثر التهاب المفاصل البكتيري على المفصل بصورة متكررة، لكن الإصابة المزدوجة غير معتادة، مما يجعل التعرف على المسببات الأولية صعباً.

الإصابة المرضية بالمكور العنقودي الذهبي شائعة في المفاصل المصابة، والأقل تكراراً هي إصابات السالمونيلا والباستيريللا والذائبة الاحمرارية. يجب محاولة الزرع والتعرف على أنواع الميكوبلازما المختلفة المسؤولة بصورة متكررة عن التهاب المفصل.

مرض مارك والإصابات غير المعدية مثل لين العظام وتآكل الفقرات وتآكل الغضروف والتسممات يجب أن تستبعد أيضاً كسبب للعرج.

متلازمة عدم الامتصاص Malabsorption Syndrome

قد تحدث التهاب المعدة الغدية وتأخر النمو وتكوين الريش غير الطبيعي بسبب عوامل أخرى مثل فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس (22) والسموم الفطرية (17). اتهم فيروس بارفو (7) وفيروس كاليسي (24) كمسبب محتمل لمتلازمة مشابهة لمتلازمة عدم الامتصاص.

آفات ا ‌ن والتأث ا لوي ا رضي مزرعة ا لية

Embryo Lesions and Cytopathic Effects in Cell Culture

تسبب العديد من الفيروسات نفوق في أجنة الدجاج التي تفرق من النفوق المسبب بفيروس ريو فقط بصعوبة. تسبب فيروسات الجدري والتهاب الحنجرة والقصبة المعدي بقعاً على الغشاء الكوريوني السقائي والذي قد يشبه تلك المسببة بفيروسات ريو. قد تسبب أيضاً فيروسات الجدري وأدينو وهيربس تأثيراً مرضياً خلوياً وأجساماً احتوائية مثل فيروسات ريو في مزرعة الخلية. قد تكون الاختبارات الفيزيوكيميائية و/أو المصلية مطلوبة لتأكيد عترة فيروس ريو.

References المراجع

1. Deshmukh, D. R., and B. S. Pomeroy. Avian reoviruses. III. Infectivity and egg transmission. Avian Dis. 13:427-439. 1969.
2. Fahey, J. E., and J. F. Crawley. Studies on chronic respiratory diseases of chickens. 2. Isolation of a virus. Can. J. Comp. Med. 18:13-21. 1954.
3. Jackson, G. G., and R. L. Muldoon. Viruses causing respiratory infection in man. IV. Reoviruses and adenoviruses. J. Infect. Dis. 128:812-833. 1973.
4. Johnson, D. C., and L. van der Heide. Incidence of tenosynovitis in Maine broilers. Avian Dis. 15:829-834. 1971.
5. Kawamura, H., F. Shimizu, M. Maeda, and H. Tsubahara. Avian reovirus: its properties and serological classification. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Yatabe) 5:115-124. 1965.
6. Kerr, K. M., and N. O. Olson. Pathology of chickens experimentally inoculated or contact-infected with an arthritis-producing virus. Avian Dis. 13:729-745. 1969.
7. Kisary, J., B. Nagy, and Z. Bitay. Presence of parvovirus in the intestine of chickens showing stunting syndrome. Avian Pathol. 13:339-343. 1984.
8. Olson, N. O., and D. P. Solomon. A natural outbreak of synovitis caused by the viral arthritis agent. Avian Dis. 12:311-316. 1968.
9. Olson, N. O., and R. Weiss. Similarity between arthritis virus and Fahey-Crawley virus. Avian Dis. 16:535-540. 1972.
10. Page, R. K., O. J. Fletcher, G. N. Rowland, D. Gaudry, and P. Villegas. Malabsorption syndrome in broiler chickens. Avian Dis. 26:618-624. 1982.
11. Petek, M., B. Felluga, G. Borghi, and A. Baroni. The Crawley agent: a reovirus. Arch. Gesamte Virusforsch. 21:414-424. 1967.
12. Robertson, M. D., and G. E. Wilcox. Avian Reovirus. Vet. Bull. 56:155-174. 1986.
13. Rosenberger, J. K. Characterization of reoviruses associated with runting syndrome in chickens. In: Proceeding No. 66, International Union of Immunological Societies, Sydney, New South Wales, Australia, pp. 141-152. 1983.
14. Rosenberger, J. K., and N. O. Olson. Viral arthritis. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 711-720. 1997.
15. Sahu, S. P., and N. O. Olson. Comparison of the characteristics of avian reoviruses isolated from digestive and respiratory tract with viruses isolated from the synovia. Am. J. Vet. Res. 36:847-850. 1975.
16. Sahu, S. P., N. O. Olson, and R. W. Townsend. Characterization of avian reoviruses isolated from the synovia and breast blister. Avian Dis. 23:896-903. 1979.
17. Stuart, B. P., R. J. Cole, E. R. Waller, and R. E. Vesonder. Proventricular hyperplasia malabsorption syndrome in broiler chickens. J. Environ. Pathol. Toxicol. 6:369-386. 1986.
18. van der Heide, L. Viral arthritis/tenosynovitis: a review. Avian Pathol. 6:271-284. 1977.
19. van der Heide, L., M. Kalbac, and M. Brustolon. Development of an attenuated apathogenic reovirus vaccine against viral arthritis/tenosynovitis. Avian Dis. 27:698-706. 1983.
20. van der Heide, L., D. Lutticken, and M. Horzinek. Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis "brittle bone disease"، "femoral head necrosis" in broiler chickens. Avian Dis. 25:847-856. 1981.
21. Walker, E. R., M. H. Friedman, and N. O. Olson. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. J. Ultrastruct. Res. 41:67-79. 1972.
22. Witter, R. L. Reticuloendotheliosis. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 467-484. 1997.
23. Wooley, R. E., T. A. Dees, A. L. Cromack, and J. B. Gratzek. Infectious enteritis of turkeys: characterization of two reoviruses isolated by sucrose density gradient centrifugation from turkeys with enteritis. Am. J. Vet. Res. 33:165-170. 1972.
24. Wyeth, P. J., N. T. Chettle, and J. Labrano. Avian calicivirus. Vet. Rec. 109:477. 1981



الفصل التاسع والثلاثون

الإصابة بفيروس آربو
ARBOVIRUS INFECTION

جيمس إ. بيرسون
James E. Pearson

الملخص Summary

فيروسات التهاب المخ الخيلي الشرقي eastern equine encephalitis (EEE)، والتهاب المخ الخيلي الغربي western equine encephalitis (WEE)، وهايلاندز جيه Highlands J (HJ)، والتهاب المخ السحائي في الرومي turkey meningoencephalitis (TME) هي فيروسات آربو التي تسبب مرضاً إكلينيكياً في أنواع الطيور. كل الأمراض التالية أعضاء في عائلة فيروسات توجا وهي: التهاب الدماغ الخيلي الشرقي، والتهاب الدماغ الخيلي الغربي، وإتش جيه وكلها تتسبب بواسطة فيروسات من جنس فيروس ألفا. وصفت الإصابة بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي وإتش جيه في أنواع الطيور ابتداء في شرق وجنوب الولايات المتحدة. الإصابات بفيروس التهاب الدماغ الخيلي الغربي سجلت لأول مرة في غرب الولايات المتحدة. يتسبب التهاب المخ السحائي أو التهاب المخ السحائي الإسرائيلي بواسطة فيروس من جنس فيروس فلافي وسجلت فقط في إسرائيل وجنوب أفريقيا. تختلف الأعراض الإكلينيكية لهذه الإصابات الفيروسية بين الدواجن وأنواع الطيور المصابة الأخرى، لكن لها أعراض مرضية نتيجة إصابة الجهاز العصبي أساساً شاملة عدم الاتزان والشلل. سجل أن فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي تسبب مرضاً في الدواجن وطيور اللعب. فيروس التهاب المخ السحائي في الرومي سجل تحت ظروف حقلية أنه يسبب مرضاً في الرومي. قد يكون النفوق عالياً حتى ٨٥٪ صاحب المرض الأساسي مع فيروس إتش جيه انخفاض إنتاج البيض في الرومي.

تعريف المسبب Agent Identification

يمكن عزل فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي من عينات حقلية بحقن الفئران حديثة الولادة وأجنة بيض الدجاج أو مزارع الخلية أو الدجاج حديث الفقس. تعرف فيروسات التهاب

الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه بواسطة تثبيت المتمم أو التألق المناعي أو اختبار التعادل بتناقص البقع أو بي آر إن plaque-reduction-neutralization (PRN). يعرف فيروس التهاب المخ السحائي في الرومي بواسطة تعادل الفيروس في مزرعة الخلية.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمكن التعرف على الأجسام المضادة النوعية لفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه في أنواع العائل البسيط اختبارات اختبار التعادل بتناقص البقع أو منع تلازن الدم، ويمكن التعرف على الأجسام المضادة الفيروسية لفيروس التهاب المخ السحائي في الرومي بواسطة اختبار منع تلازن الدم.

مقدمة Introduction

تضم فيروسات آربو مجموعة كبيرة من الفيروسات تجتمع سوياً بقدرتها على التكاثر والانتقال في وبواسطة الحشرات. تصاب عوائل الطيور بعدد من فيروسات آربو وتستخدم الطيور كدليل في اكتشاف دخول فيروسات آربو إلى منطقة ما. سجلت الأنواع الأربعة من فيروسات آربو أنها تسبب أمراضاً في عوائل الطيور. عزلت فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي كثيراً في النصف الغربي على الرغم أن كل التقارير عن المرض في الدواجن أو أنواع الطيور المستأنسة من الولايات المتحدة ومعظم الإصابات تتسبب بواسطة فيروس التهاب الدماغ الخيلي الشرقي. سجل المرض الإكلينيكي لفيروس التهاب الدماغ الخيلي الشرقي بصورة مبدئية في الشوكار الصغير والسمان والفزان في شرق وجنوب الولايات المتحدة. أيضاً سجلت حالات عزلت من البط الصغير والرومي وطيور الكركي. المرض الإكلينيكي المسبب بفيروس التهاب الدماغ الخيلي الغربي نادر لكن تم تسجيله في الدجاج والفزان والرومي. حديثاً سجلت حالات إصابة بفيروس التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي في طيور الإميو (1 ,5 ,9).

سجل فيروس إتش جيه أنه يسبب مرضاً في شرق الولايات المتحدة، والأعراض الإكلينيكية الأولية الملحوظة هي انخفاض إنتاج البيض في الرومي (10). سجل فيروس الرومي في إسرائيل وجنوب أفريقيا. الرومي هو العائل الطيري الوحيد الذي يصاب إكلينيكياً (2 ,3 ,4). يعمل البعوض كعائل بيولوجي في إدخال الفيروس إلى القطعان. يمكن أن ينتقل الفيروس خلال التقاط الريش والافتراس. فيروس الرومي هو مرض في الولايات المتحدة ويجب أن يبلغ إلى هيئات صحة الحيوان. نتيجة الأهمية على الصحة العامة فإنه يجب التبليغ عن حالات الإصابات الفيروسية المؤكدة لفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي أو التهاب الدماغ الخيلي الغربي إلى جهات الصحة العامة وصحة الحيوان.

سجلت إصابات شديدة ونفوق بسبب فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي في عمال المعامل. بالتالي يجب أن يؤدى أي عمل لهذه الفيروسات في معامل الأمان الحيوي المستوى الثاني باستخدام كبائن أمان ويجب تحصين كل الأشخاص المعرضين لمنع العدوى (7). إذا لم تتوفر إجراءات أمن مناسبة لا يجب عزل هذه الفيروسات. فالبديل هو أن ترسل كل الأنسجة من الحالات المشتبهة أو المعزولات الممكنة إلى معمل مرجعي.

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

الأعراض المبدئية الإكلينيكية لهذه الإصابات هي خلل الجهاز العصبي. الأعراض العصبية تلاحظ أساساً في الطيور الصغيرة المصابة بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي ، إلا أنه في طيور الإميو تتطور الأعراض عند كل الأعمار عقب الإصابة. لوحظ التهاب المخ السحائي أساساً في الرومي الأكبر من ثمانية أسابيع (5). تشمل الأعراض الخمول وفقد الاتزان وشلل الرجل والجناح والتواء الرقبة وارتعاشات وتمدد على الأرض والموت. قد تختلف الشدة بين الطيور والقطعان والأنواع. في بعض الحالات قد يكون المرض حاداً جداً مع الرقاد على الأرض والموت فقط. لوحظ الالتهاب المعوي النزفي في الإميو المصابة بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي. قد تكون معدلات الإصابة والنفوق أعلى من ٨٥٪. تحت الظروف الطبيعية المرض الإكلينيكي الأولي المسجل مع الإصابة بفيروس إتش جيه هو نقص إنتاج البيض في الرومي. لوحظ أيضاً نفس العرض مع التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب المخ السحائي. لم تصاحب العدوى بهذه الأربوفيروس بتغيرات مرضية مميزة أو آفات نسيجية مرضية. الوصف الكامل للأمراض المرتبطة مع فيروسات آربو وصف بواسطة Guy (2).

ع العينات Sample Collection

الطريقة الأفضل للتشخيص والتعريف هي عزل الفيروس. يجب أن يجرى الفحص التشريحي للطيور المشتبهة إصابتها بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي في كبائن بها أمان بيولوجي. يجب اختبار الطائر للفحص بمجرد ظهور الأعراض لأن وجود الفيروس في الدم قد يكون لفترة قصيرة. تجمع أنسجة المخ والكبد والطحال. يجب جمع المصل من طيور بها إصابة تحت حادة لأن الأجسام المضادة تكتشف غالباً في الطيور التي بها أعراض مرضية. تحفظ الأنسجة عند −٧٠ °م في حالة عدم الحاجة إلى الفحص فوراً. للعزل يجهز معلق ١٠٪ من الأنسجة مع محلول ملح الفوسفات (بي إتش ٧,٨) يحتوي على ٠,٧٥٪ مصل أجنة العجول ١٠٠ وحدة/مل من البنسيلين، و١٠٠ ميكروجرام/ مل ستربتومايسين ويطرد المعلق مركزياً عند سرعة ١٥٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة.

أوساط الزرع المفضلة Preferred Culture Media and Substrates

الفأر حديث الولادة عائل شديد الحساسية. يحقن فأر عمره ١ إلى ٤ أيام في المخ بطعم ٠.٠٢ مل بواسطة محقن اختبار السل. مكان الحقن عند جانب خط الوسط إلى الجزء الأوسط لإحدى نصفي المخ الجانبي. تلاحظ الفئران لمدة ٧ أيام، وتجمع الفئران النافقة يومياً وتجمد عند −٧٠ْ م. تجمع أمخاخ الفئران للتعرف على الفيروس بالسحب باستخدام محقن السل. يجرى التمرير الثاني فقط إذا لم يتم التعرف على الفيروس من الفئران التي نفقت عقب الحقن.

يعتبر جنين الدجاج أقل حساسية عن الفئران للعزل الأولي، إلا أنه وصف كطريقة مثلى لعزل فيروس التهاب المخ السحائي في الرومي (3). يشتبه دائماً في إصابة فيروس آربو عند عزل فيروس مميت للجنين من طيور بها مرض عصبي.

يحقن معلق النسيج في كيس المح لجنين بيض الدجاج عند عمر ٦ — ٨ أيام وعادة لا تحدث آفات مرضية في الجنين، إلا أن الجنين المصاب بفيروس الرومي يكون عادة لونه أحمر فاتح قبل النفوق (3). يجب أن تحضن الأجنة لمدة أسبوع لكن يحدث النفوق عادة ٢ — ٤ أيام بعد الحقن. التقليدي، تكون تمريرة واحدة فقط ضرورية، فيما عدا إذا لم يتم التعرف على الفيروس من الأجنة النافقة.

الصيصان حديثة الفقس قابلة للإصابة واُستخدمت لعزل الفيروس، إلا أن هذه الطريقة غير مفضلة لفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي لأن الطيور المصابة تفرز الفيروس المعدي بكثرة. يعزل فيروس آربو أيضاً في عدة أنظمة مزرعة، لكنها أقل حساسية من الفئران وأكثر الخلايا شيوعاً هي الخلايا الابتدائية من الخلايا الليفية لأجنة الدجاج والبط وخط الخلايا المستمر من Vero، وbaby hamster kidney-21 (BHK-21)، وrabbit kidney-13 (RK-13). يجرى العزل عادة في قوارير مزرعة خلية ٢٥ سم^{٢}. تحقن طبقة الخلايا المندمجة بكمية ١ مل من المعلق بعد ساعة فترة ادمصاص يتم غسل الخلايا ويضاف وسط الحفظ وتحضن لمدة أسبوع ويجرى تمرير أعمى واحد. تنتج الفيروسات الأربعة تأثيراً مرضياً خلوياً. تجمد المزارع التي بها تأثير مرضي خلوي. تذاب المزارع للتعرف الفيروسي.

تعريف المسبب Agent Identification

تنتمي فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه تحت جنس فيروس ألفا من عائلة توجا، بينما فيروس التهاب المخ السحائي من جنس فلافي.

الصفات الكيميائية والفيزيائية Chemical and Physical Characteristics

هذه الفيروسات لها حمض نووي آر إن إيه محاط بغلاف دهني وهي حساسة للإيثير والكلولوفورم، ويتكون الكابسيد من ٣٢ كابسوميراً في نظام ثماني يضم مجين آر إن إيه مفرد الشريط.

تعريف الف وس Virus Identification

يمكن التعرف على فيروسي التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي في أمخاخ الفأر المصابة أو سوائل مزرعة الخلية أو السوائل السقائية القانقي والسلسي بواسطة اختبار تثبيت المتمم. يحضر معلق ١٠٪ من أمخاخ الفئران في محلول فيرونال، وتستخدم سوائل البيض أو مزارع الخلية غير مخففة أو تخفف ١ : ١٠ في محلول فيرونال. تطرد مركزياً عند ٩٠٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة وتختبر السوائل الرائقة ضد المصل فائق المناعة أو السائل الاستسقائي المحضر ضد فيروسات آربو المشتبهة باستخدام طريقة تثبيت المتمم القياسية (6). يتطلب اختبار تثبيت المتمم تحضين مخلوط الأنتيجين والمصل طوال الليل مع ٧ وحدات من المتمم. يمكن التعرف على فيروسات آربو في مزرعة الخلية بطريقة صباغة التألق المناعي غير المباشرة. يمكن أيضاً التعرف على فيروس الرومي بواسطة اختبار تعادل الفيروس أو اختبار منع تلازن الدم، والأمخاخ من الفئران المصابة بفيروس الالتهاب المخ السحائي تلزن كرات دم الأوز الحمراء (3). الطريقة الأقل شيوعاً للتعرف على فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الغربي والتهاب الدماغ الخيلي الشرقي هي اختبار التعادل بتناقص البقع كما هو موضح في الفقرة التالية.

اُكتشف وجود الحمض النووي لفيروس التهاب الدماغ الخيلي الشرقي في البعوض والأنسجة باختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (9). يستخلص الحمض آر إن إيه بواسطة الفينول وحمض جوانيديام أيزوثيوسيانات. تحضر البوادئ من تتابع مشفر لجين الكابسيد. يستخدم ٤٠ تكراراً لدورة تكبير ثلاثية الخطوة: ٩٤ °م لمدة ١ دقيقة، و٥٦ °م لمدة ١ دقيقة، و٧٢ °م لمدة ١ دقيقة. الخطوة النهائية عند ٧٢ °م لمدة ٥ دقائق تكمل امتداد البادئ. تتحلل منتجات التفاعل أو امتدادها القصري على ٢٪ - ٢,٦٪ آجاروز سبق صياغته مع ١ ميكروجرام/مل من بروميد الإيثيديوم. يكون البديل بواسطة التهجين مع مسبار نوعي.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمكن أن يجرى التشخيص الافتراضي للإصابة بفيروس آربو باستخدام عينة مفردة من المصل من طائر ناقه من المرض أو طيور بها أعراض مرضية. يمكن أن يجرى التأكيد باختبار أمصال مزدوجة مجموعة على فترة أسبوعين. اتحاد اختباري تناقص البقع مع منع تلازن الدم أو اختبار تناقص البقع منفرداً هي طرق تستخدم أكثر شيوعاً لكشف الجسم المضاد لفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه. يسمح اختبار تناقص البقع

بتفريق الأجسام المضادة المنتجة بواسطة فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي شديدة التقارب أنتيجينياً. التفريق بين الجسم المضاد لفيروس التهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه صعب جداً بسبب تقارب العلاقة الأنتيجينية. يمكن أن يجرى التشخيص الافتراضي المبني على الجزء من البلد الذي نشأ منه الطائر. المعيار الأعلى لاختباري التعادل بتناقص البقع ومنع تلازن الدم لفيروس آربو النوعي أيضاً تعطي دلالة على نوع الفيروس. يمكن أن يستخدم اختبار منع تلازن الدم منفرداً للتعرف على الجسم المضاد لفيروس التهاب المخ السحائي للرومي، ونادراً ما يستخدم اختبار تثبيت المتمم لكشف الجسم المضاد لفيروس آربو في مصل الطيور.

اختبار التعادل بتناقص البقع PRN Test

يجرى في الخلايا الليفية لأجنة بيض البط أو خلايا فيرو. يمكن أن تختبر الأمصال عند تخفيفات نهائية ١ : ١٠ و١ : ١٠٠. يختبر المصل المستخدم في اختبار التعادل بتناقص البقع ضد ١٠٠ وحدة مكونة للبقع من الفيروس. يحضن خليط الفيروس والمصل عند ٣٧ °م لمدة ساعة و١٥ دقيقة قبل الحقن في طبقة الخلايا الواحدة المندمجة في قوارير ٢٥ سم٢. يترك الطعم لمدة ساعة ويعقبه إضافة ٦ مل من وسط التغطية المتكون من محلولين منفردي التجهيز. يحتوي المحلول XC I محلول ملح إيرلي القاعدي بدون الفينول الأحمر، و٦,٦٪ مستخلص خميرة، و٤٪ مصل أجنة الأبقار، و٨٠٠ وحدة/مل بنسللين، و٤٠٠ ميكروجرام/مل ستربتوميسين، و٢٠٠ ميكروجرام/مل نيستاتين، و٦٪ من ٧,٥٪ محلول بيكربونات صوديوم، و٣,٣٪ من تخفيف ١ : ١٥٠٠ من الأحمر المتعادل (١ : ٨٠٠٠).يتكون محلول II من آجار نوبل ٢٪ سبق تعقيمه ويحفظ عند ٤٧ °م. تخلط أحجام متساوية من محاليل I و II وتضبط درجة الحرارة عند ٤٧ °م مجرد قبل الاستخدام. يحضن الاختبار لمدة ٤٨ — ٧٢ ساعة وتبنى نقط النهاية على ٩٠٪ تناقص في عدد البقع بالمقارنة مع قوارير الفيروس الضابط التي تحتوي على ١٠٠ بقعة.

اختبار منع تلازن الدم Hemagglutination-Inhibition Test

يستخدم مستخلص مخ الفأر بواسطة الأسيتون والسكروز كأنتيجين. يثبط الأنتيجين الإيجابي بالمعالجة بواسطة بيتا-بريبولاكتون عند تركيز نهائي ٠,١٪. في غياب المصل المرجعي الدولي يجب أن يعاير الأنتيجين لتحضير ٤ — ٨ وحدات ملزنة للدم لتستخدم في اختبار منع تلازن الدم. يحدد مستوى التلازن ودرجة الأس الهيدروجيني الأمثل لكل أنتيجين مع خلايا دم الأوز الحمراء المخففة في محاليل تتراوح درجة الأس الهيدروجيني لها من ٥,٨ — ٦,٦ على مسافة ٠,٢. تخفف الأمصال ١٠/١ في محلول ملح بورات وبي إتش ٩ وتثبط عند ٥٦ °م لمدة ٣٠ دقيقة. تستخدم المعالجة بالكاولين للإزالة مثبطات المصل غير النوعية. يجب أن تمتز الأمصال مع حجم ٠,٠٥ مل من خلايا دم الأوز الحمراء المعبأة المغسولة لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م لإزالة ملزنات المصل الطبيعية. يضاف المصل إلى طبق

المعايرة الدقيق المكون من ٩٦ حفرة مستديرة القاع في تخفيفات ثنائية في محلول ملح بورات، وبي إتش ٩ ويحتوي على ٠,٤٪ زلال مصل أبقار. تضاف أحجام متساوية من الأنتيجين إلى المصل المخفف وتحضن الأطباق عند ٤°م طول الليل. تؤخذ كرات الدم الحمراء من ذكر الأوز الأبيض الطبيعي وتغسل ثلاثة مرات في محلول دكستروز-جيلاتين-فيرونال ويخفف معلق ٧٪ بنسبة ١/٢٤ في محلول بي إتش مناسب فوراً قبل الإضافة إلى الأطباق. تغلق الأطباق بشريط شفاف وتحضن لمدة ٣٠ دقيقة عند ٣٧°م قبل قراءة النتائج. تضم الأمصال الضابطة السالبة والإيجابية إلى كل اختبار. يعتبر الاختبار صالحاً فقط إذا أعطت الأمصال الضابطة النتائج المتوقعة. المعايير من ١/١٠ و١/٢٠ تكون محل اشتباه، والمعايير ١/٤٠ فأكثر تعتبر موجبة.

التفريق من العوامل ا مرضة ا شا ة Differentiation from Closely Related Agents

الإصابات الفيروسية بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي والتهاب المخ السحائي تحدث أعراضاً إكلينيكية في الدواجن تشبه جداً اضطرابات الجهاز العصبي المركزي التي تسببها عوامل أخرى مثل فيروس مرض نيوكاسيل وفيروس التهاب المخ الطيري والمطثية الوشيقية. تسبب جميع فيروسات آربو انخفاضاً في إنتاج البيض مشابهة لتلك المسببة بفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية في الرومي. يمكن تفريق هذه العوامل بالعزل والتعرف على العامل المسبب أو بواسطة الاختبارات المصلية. يمكن أن يفرق اللقاح الحي المضعف لفيروس التهاب المخ السحائي من العترات الضارية بواسطة اختبار معامل الإمراضية في العضل والذي يجرى في صغار الرومي عند عمر يوم (3).

ا راجع References

1. Ayers, J. R., T. L. Lester, and A. B. Angulo. An epizootic attributable to western equine encephalitis virus infection in emus in Texas. J. Am. Vet. Med. Assoc. 205:600-601. 1994.
2. Guy, J. S. Arbovirus infections. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 765-772. 1997.
3. Ianconescu, M. Turkey meningoencephalitis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd ed. H. G. Purchase L. H. Arp, C. H. Dommermuth, and J. E. Pearson, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pa. pp. 163-164. 1989.
4. Malkinson, M. Turkey meningo-encephalitis. In: Virus infection of birds. J. B. McFerran and M. S. McNulty, eds. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 243-245. 1993.
5. Randolph, K. D., S. L. Vanhooser, and M. Hoffman. Western equine encephalitis virus in emus in Oklahoma. J. Vet. Diagn. Invest. 6:492-493. 1994.
6. United States Department of Health, Education, and Welfare. A guide to the performance of the standardized complement fixation method and adaptation to micro test. Centers for Disease Control, Atlanta, Ga. 1974.
7. United States Department of Health and Human Services. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1993.
8. Veazey, R. S., C. C. Vice, D.-Y. Cho, T. N. Tully, Jr., and S. M. Shane. Pathology of eastern equine encephalitis in emus (Dromaius novaehollandiae). Vet. Pathol. 31:109-111. 1994.

9. Vodkin, M. H., G. L. McLaughlin, J. F. Day, R. E. Shope, and R. J. Novak. A rapid diagnostic assay for eastern equine encephalomyelitis viral-RNA. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49(6):772-776. 1993.
10. Wages, D. P., M. D. Ficken, J. S. Guy, T. S. Cummings, and S. R. Jennings. Egg-production drop in turkeys associated with alphaviruses: eastern equine encephalitis virus and Highlands J virus. Avian Dis. 37:1163-1166. 1993.

مرض البيرسا المعدي ومرض جمبورو
INFECTIOUS BURSAL DISEASE

جون ك. روزنبر غ، وي. م. سيف، ودارال ج. جاكوود
John K. Rosenberg, Y. M. Saif, and Daral J. Jackwood

ا لخص Summary

مرض البيرسا المعدي هو مرض حاد مدمر للخلايا الليمفاوية في الدجاج الصغير ويسببه فيروس مزدوج الشريط الريبوزي والمقاوم بشكل غير اعتباري للقتل بواسطة كلٍّ من الحرارة والعديد من المطهرات الشائعة. يتواجد هذا الفيروس في جميع أنحاء العالم في كل مناطق إنتاج الدواجن الرئيسية. الشكل الإكلينيكي للمرض والذي يحدث في الدجاج عند عمر ٣ – ٦ أسابيع يمكن أن يتسبب في نفوق مرتفع. يوجد الشكل تحت الإكلينيكي قبل أسبوعين من العمر ويرتبط مع التثبيط المناعي الملحوظ.

تعريف ا سبب Agent Identification

يمكن أن يجرى التشخيص اعتماداً على الآفات العينية والمجهرية ، لكن العزل يقوي التشخيص.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمكن أن تعطي نتائج الفحص المصلي من اختبار إليزا تشخيصاً افتراضياً عند مصاحبتها بالمرض الإكلينيكي والآفات العينية. يمكن أن يجرى التأكيد بواسطة اختبار الترسيب في الآجار واختبار تعادل الفيروس.

ا قدمة Introduction

مرض البيرسا المعدي هو مرض حاد عالي الوبائية وقاتل للخلايا الليمفاوية للدجاج الصغير غير البالغ ويسببه فيروس آر إن إيه مزدوج الشريط. يسمى المرض غالباً جمبورو نسبة إلى المدينة حيث أدرك المرض فيها لأول مرة (9). هو مرض واسع الانتشار على مستوى العالم في أغلب مناطق إنتاج الدواجن ويعتبر مهم اقتصادياً بسبب

قدرته على إحداث تثبيط مناعي جارف في الدجاج مع زيادة القابلية للإصابات البكتيرية والفيروسية وتقليل الاستجابة للقاحات. على الرغم من عزل الفيروس من أنواع طيور أخرى مثل الرومي والنعام، إلا أن المرض يلاحظ حالياً في الدجاج فقط.

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

يحدث عامة الشكل الإكلينيكي للمرض في الطيور التي عمرها من ٣ – ٦ أسابيع التي نفذت منها الأجسام المضادة الأمية لفيروس جمبورو. قد تبدو الطيور المصابة خاملة وليس لديها قابلية للأكل ومنتفشة الريش وتخرج إسهالاً مائياً مصبوغاً باللون الأخضر ومحتوياً على أملاح حمض البوليك. يكون النفوق متفاوتاً لكن يصل لأعلى معدل وهو ٥٠٪ تبعاً لعترة الفيروس والإصابات المركبة ويكون النفوق عادة أعلى في دجاج لجهورن مقارنة بالطيور من النوع اللاحم. بعد العدوى بحوالى ٤ – ٦ أيام، تكون البيرسا المجمعية (بيرسا فابريشياس) متضخمة وأحياناً نزفية وغالباً مغطاة بإفرازات أو ارتشاحات جيلاتينية صفراء. يعقب ذلك ضمور البورصة الذي يحدث بعد الإصابة بحوالى ٧ – ١٠ أيام. تسبب بعض مغايرات فيروس جمبورو ضموراً في البيرسا فقط (11).

تشمل الآفات المجهرية نخراً في البيرسا والطحال والغدة التوتية وغدة هاردر واللوزات الأعورية. البيرسا هي الأكثر تأثراً وتتصف بالنخر في الخلايا الليمفاوية النخاعية ويعقب ذلك الإحلال بالخلايا متعددة النواة والخلايا البلعمية. يحدث الشكل تحت الحاد للمرض في طيور أقل من أسبوعين. تصاب الأنسجة الليمفاوية لكن الدليل المرئي الوحيد للإصابة قد يكون الضمور الشديد للبيرسا. يعتبر الشكل تحت الحاد مهماً جداً لأنه يحدث تثبيطاً مناعياً شديداً.

ع العينات Sample Collection

يمكن أن يعزل فيروس مرض البيرسا المعدي بسهولة من معظم الأنسجة الليمفاوية أثناء المراحل المبكرة للمرض (٣ – ٦ أيام بعد العدوى)، إلا أن البيرسا هي الهدف الأساسي وتحتوي عامة على تركيزات أعلى من الفيروس لفترات طويلة عن الأنسجة الأخرى، وبالتالي يعتبر النسيج الصاحب المفضل لمحاولات العزل (9). إذا اُختبرت البيرسا يجب أن يوضع في الاعتبار أنها ملوثة بعوامل انتهازية مثل فيروس ريو أو فيروس أدينو أو فيروس أنيميا الدجاج والتي تضاعف أو تعقد عملية التعرف.

لأن المرض حاد وإصابة الفيروس مؤقتة، يجب أن تجمع البيرسا من حد أدنى خمسة طيور مصابة إكلينيكياً وتحفظ متجمدة انتظاراً لمحاولات العزل. يجهز معلق ٢٠٪ (وزن/حجم) من متجانس البيرسا في شوربة فوسفات تربتوز مع مضادات حيوية (١٠٠٠٠ وحدة دولية/مل من بنسللين، و١٠٠٠٠ مجم/مل من ستربتوميسين)، ويطرد المعلق مركزياً عند ١٥٠٠ إكس جي لمدة ٢٠ دقيقة ويجمع الرائق ويحفظ متجمداً عند –٢٠ °م أو في مبرد.

أوساط الزرع ا فضلة Preferred Culture Media and Substrates

يمكن تنمية فيروس مرض البيرسا المعدي الضاري واللقاحي في أجنة بيض دجاج عند عمر ٩ — ١١ يوماً مأخوذة من دجاج خالي من الأجسام المضادة الأمية للفيروس. الغشاء الكوريوني السقائي هو الأكثر حساسية على الرغم من أن الأجنة المحقونة بطريق كيس المح أيضاً تصاب بمعظم المعزولات. آفات الجنين ومعدلات النفوق قد تختلف اعتماداً على نوع فيروس مرض البيرسا المختبر. حقن المعزولات الكلاسيكية للفيروس بواسطة الغشاء الكوريوني تقتل الأجنة بعد الحقن ٣ — ٥ أيام. الأجنة النافقة تكون محتقنة مع أنزفة نقطية وبقعية ظاهرة بطول جسم الريشة ومفاصل الأصابع والمنطقة المخية. قد يكون الكبد متضخماً لكن عادة له مظهر شاحب بينما الطحال يكون وردياً أو فاقداً للون غالباً، وصغيراً إلى طبيعي الحجم مع بؤر نخرية صغيرة أحياناً. الغشاء الكوريوني السقائي عادة لا يصاب على الرغم أنه بصورة غير متكررة تشاهد أنزفة سطحية منعزلة. يمكن أن تعزل العترات المغايرة لفيروس مرض جمبورو وتنمى في أجنة الدجاج مع سهولة نسبية عندما تحقن بطريق الغشاء الكوريوني السقائي لكن عامة لا تقتل الأجنة. يجب أن تفحص الأجنة الحية ٦ — ٧ أيام بعد الحقن لوجود الآفات النموذجية التي تتكون خارجياً من أوديما المخ والبطن، تقزم ولون غير أبيض أو كريمي. نادراً إما تكون الأجنة محتقنة أو نزفية. الأكباد عادة تصبغ بلون أصفر ونخرية بينما الطحالات عادة تكون متضخمة مرتين أو ثلاثة مرات لكنها عادية اللون. يوجد التركيز الأعلى للفيروس في الغشاء الكوريوني السقائي وأنسجة الجنين شاملاً الأحشاء بعد الحقن بفترة ٦ — ٧ أيام بكلٍ من الشكل المغاير أو الكلاسيكي للفيروس. تحتوي سوائل البيض على فيروس أقل من الأجزاء الأخرى للجنين. بالرغم أن العزل الأولي لفيروس مرض البيرسا أفضل ما يكون أن يصاحب بواسطة حقن الجنين، إلا أن الفيروس يجب أن يتأقلم لمزارع الخلية (10, 9, 5). يمكن أن ينمى الفيروس في خلايا بيرسا جنين الدجاج وخلايا الكلى والخلايا الليفية محدثاً تأثيراً مرضياً خلوياً. يمكن أن يعزل الفيروس على مختلف خطوط الخلية الثديية المعروفة شاملاً خطوط الخلية الليمفاوية وغير الليمفاوية (8, 5).

تعريف ا سبب Agent Identification

الشكل ا ورفولوجي وا صائص الفيزيوكيميائية
Morphology and Physicochemical Properties

فيروس مرض البيرسا هو فيروس ثماني الأضلاع ولا يحتوي على غلاف من عائلة فيروسات بيرنا، وجنس فيروس بيرنا الذي يكون قطره تقريباً ٦٠ نانوميكروناً. المجين هو حمض نووي ريبوزي مزدوج الشريط يتكون من قطعتين بأوزان جزيئية ٢,٢ x $١٠^{٦}$ و٢,٥ x $١٠^{٦}$.

عرفت خمسة بروتينات تركيبية مكونة للكابسيد المتكون من ٣٢ كابسوميراً (9). فيروس مرض البيرسا المعدي مقاوم للحرارة ويظل معدياً بعد المعالجة عند ٥٦ ْم لمدة ٥ ساعات على الأقل. لا يتأثر الفيروس بالإيثير أو

الكلوروفورم أو الأس الهيدروجيني ٢ لكن يقتل عند أس هيدروجيني ١٢. تقل إمراضية الفيروس بشكل ملحوظ عقب المعالجة بتركيز ٠,٥٪ فورمالين لمدة ٦ ساعات، بينما مشتقات الفينول ومطهرات الأمونيوم الرباعية تكون نسبياً غير مؤثرة في تقليل معيار الفيروس (1). مقاومة الفيروس هي سبب بقاؤه على المزارع الملوثة لفترة طويلة بالرغم من التنظيف والتطهير الشديد.

تعريف الف وس Virus Identification

يمكن استخدام اختبار الترسيب في هلام الآجار لكشف أنتيجين المجموعة النوعي لفيروس مرض البيرسا. يحضر الأنتيجين من متجانس البيرسا من طيور في المرحلة الحادة للمرض. يخلط متجانس البيرسا بنسبة ١ : ١ (وزن/حجم) مع محلول الملح المعقم ويجمد ويذاب ثلاثة مرات ويطرد مركزياً عند سرعة قليلة (٣٠٠ إكس جي) وتحجز السوائل الرائقة كأنتيجين ويختبر ضد مضاد مصل معلوم لفيروس مرض البيرسا المعدي. يجب أن يستخدم اختبار تعادل الفيروس لتعريف الفيروس في الأجنة أو في مزرعة الخلية بعد التأقلم لأنظمة العائل هذه. وصف اختبار إليزا الجاذب للأنتيجين (AC-ELISA) لكشف وتوصيف معزولات الفيروس (12 ,13). الأجسام المضادة المتعددة يمكن أن تستخدم أيضاً في إليزا جاذبة الأنتيجين وقد تكون أكثر فعالية للمسح العام لعينات الأنسجة لفيروس مرض البيرسا المعدي (9).

أظهرت اختبارات التألق المناعي المباشرة وغير المباشرة أنها عالية الكفاية لكشف الأنتيجينات الفيروسية في الأنسجة المصابة. بالمثل تستخدم الكيمياء الخلوية المناعية لنفس الغرض.

يمكن أن تتفرق عترات فيروس مرض البيرسا المعدي على أسس النمط الإمراضي pathotype والشكل الأنتيجيني. يوجد على الأقل نوعان مصليان واضحان وأنماط أنتيجينية عديدة (5 ,6 ,9) التي يمكن أن تعرف بواسطة اختبارات التعادل التصالبي والإعداء التصالبي cross challenge. قد تختلف معزولات الفيروس في الإمراضية في كونها غير ممرضة إلى ضارية. الأخيرة تكون قادرة على إحداث نفوق عالي وتسبب دماراً شديداً للأنسجة الليمفاوية. قد تدمر المعزولات المغايرة حديثة التعرف على البيرسا بدون التهابات أو أوديما مصاحبة (11).

التعرف ا ـزيئي Molecular Identification

يمكن أن يستخدم النسخ العكسي المتبع بتفاعل البلمرة المتسلسل لكشف إصابة الدجاج بفيروس مرض البيرسا المعدي (2 ,7 ,14). تفريق العترات يكون ممكناً إذا اُختبرت منتجات تفاعل البلمرة أكثر باستخدام الإنزيمات الهاضمة (3 ,4 ,8). باستخدام اختبار النسخ العكسي/تفاعل البلمرة المتسلسل—الإنزيمات الهاضمة (RT/PCr-RE) لوحظت ١٠ أشكال قصرية مختلفة عند فحص ٢٢ عترة لفيروس مرض البيرسا المعدي (6). بالرغم من عدم ارتباط

الشكل القصري مع نتائج تعادل الفيروس التصالبي خارج الجسم، إلا أن اختبار (RT/RCR-RE) فرق ٢٢ فيروساً مختبراً إلى ثلاثة مجاميع جزيئية. احتوت مجموعة واحدة على فيروسات مغايرة فقط، واحتوت المجموعة الثانية على فيروسات كلاسيكية فقط، واحتوت المجموعة الثالثة على فيروسات مغايرة وكلاسيكية. في دراسة أخرى (5)، فرقت عترات فيروس مرض البيرسا المعدي التي اُعتبرت متشابهة جداً أنتيجينياً. لم توجد إمكانية لعمل ارتباط بين الإمراضية واختبار النسخ العكسي/تفاعل البلمرة المتسلسل/تباين طول القطع المهضومة في ذلك الوقت.

يمكن استخدام اختبار النسخ العكسي/تفاعل البلمرة المتسلسل/تباين طول القطع المهضومة للتفريق بين عترات فيروس مرض البيرسا المعدي على أسس الضراوة. في دراسة واحدة (11)، تم تفريق ٧١ معزولة حقلية يابانية إلى ثلاثة أنماط ممرضة: عالية الضراوة وضارية ولقاح حي مضعف.

يمكن أن يستخدم معالجة نسيج البيرسا المصاب بالفيروس بواسطة فينول : كلوروفورم : كحول أيزو إميلي (٢٥ : ٢٤ : ١) لتثبيط الفيروس بينما تحافظ على الحمض الريبوزي المطلوب لاختبار النسخ العكسي/تفاعل البلمرة المتسلسل/تباين طول القطع المهضومة (2) كما تمكن من نقل العينات غير المعدية.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

يمكن أن يستخدم اختبار الترسيب في الآجار لكشف ومعايرة الأجسام المضادة في الطيور الناقهة من الإصابة. لمعايرة الأجسام المضادة تُعمل عادة تخفيفات ثنائية من المصل للحصول على نقطة نهاية. يجهز الأنتيجين من متجانس البيرسا المجموعة من طيور مصابة تجريبياً بعد ٣ – ٦ أيام من الإصابة. يجرى الاختبار كما وصف سابقاً.

يستخدم أيضاً اختبار تعادل الفيروس لمعايرة الأجسام المضادة. يجرى هذا الاختبار روتينياً في أنظمة معايرة دقيقة باستخدام الفيروس المتأقلم على مزرعة الخلية ومزرعة الخلايا الليفية لجنين الدجاج. تُجهز تخفيفات ثنائية من المصل في وسط ١٩٩ ويضاف (٠,٠٢٥ مل/حفرة) إلى الأطباق الدقيقة المحتوية على طبقة واحدة مندمجة عمرها ٢٤ ساعة من الخلايا الليفية لجنين الدجاج، وتحقن الخلايا بكمية ١٠٠٠ وحدة مكونة للبقع من الفيروس لكل حفرة وتحضن لمدة ٥ أيام عند ٣٧°م. قد يقلل تركيز الفيروس لتحسين الحساسية إذا كان معدل الأجسام المضادة قليلاً. عقب التحضين، يزال وسط النمو (وسط ١٩٩ و٥٪ مصل أجنة العجول) وتشطف الخلايا بمحلول منظم الفورمالين ١٠٪ لمدة خمس دقائق. يسكب الفورمالين وتصبغ الخلايا لمدة ثلاث دقائق بالكريستال فيولت ١٪. معيار التعادل يعبر عنه بمقلوب أعلى تخفيف من المصل الذي يمنع التأثير الخلوي المرضي. يعتبر اختبار تعادل الفيروس أكثر حساسية عن اختبار الترسيب ومن ثَم يجب استعماله عندما تكون مستويات الأجسام المضادة قليلة أو عندما تكون المعايرة ضرورية.

في الأعوام الحديثة ، اُستخدمت الإليزا في معايرة الأجسام المضادة لفيروس مرض البيرسا المعدي. يمكن شراء أطقم الاختبار من مصادر تجارية (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.; IDEXX, Westbrook, Maine) ولها ميزة الحاجة إلى كميات صغيرة من المصل مع نتائج متوافقة محسنة. لا ترتبط نتائج الإليزا دائماً مع نتائج اختبار تعادل الفيروس.

التفريق من العوامل ا مرضة ا شا ة Differentiation from Closely Related Agents

يشخص مرض جمبورو الإكلينيكي بسهولة بسبب آفات البيرسا العينية والمجهرية المميزة الملحوظة أثناء المرحلة الحادة للمرض ، إلا أن ضمور البيرسا الذي يحدث عقب المرض الإكلينيكي أو تحت الإكلينيكي قد يكون موجوداً أيضاً مع ظروف أخرى مثل مرض مارك والتسمم بالسموم الفطرية والإصابة بفيروس أنيميا الدجاج أو فيروسات ريو المنتجة المختارة. الاستجابة النسيجية مع هذه الظروف يختلف عامة عن تلك الموجودة في مرض جمبورو. الآفات النزفية المشاهدة أحياناً مع مرض جمبورو قد تشاهد أيضاً مع فيروس أنيميا الدجاج والتسمم الكيميائي أو الدوائي. تدمير الخلايا الليمفاوية الشديد والأنزفة تحت الجلدية والتغيرات في الأعضاء الدموية تكون شائعة في الطيور المصابة بمرض أنيميا الدجاج وجمبورو عند عمر صغير(≤ أسبوعين). فشل والتهاب الكلى الموجود أحياناً في الطيور التي تنفق من مرض جمبورو تنتج عادة من عدم شرب الماء. العترات السامة للكلى من فيروس الالتهاب الشعبي المعدي قد تحدث آفات شبيهة لكن يمكن تفريقها بسبب عدم وجود تغيرات في البيرسا وترتبط طبيعياً مع المرض التنفسي الحاد.

لأن فيروس مرض البيرسا المعدي قادر على إحداث التثبيط المناعي ، قد يعمل كعامل مهيئ لظروف أخرى مثل التهاب الجلد الغرغريني ومتلازمة الأنيميا النخاعية النزفية والتهاب الكبد ذو الأجسام الاحتوائية والمرض التنفسي. تداخل فيروس مرض البيرسا المعدي في المرض المركب لهذه الأنواع يشخص عادة بواسطة رؤية آفات البيرسا الدائمة أو الدليل المصلي لإصابة سابقة بفيروس مرض البيرسا المعدي.

ا راجع References

1. Benton, W. J., M. S. Cover, J. K. Rosenberger, and R. S. Lake. Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). Avian Dis. 11:438-445. 1967.
2. Jackwood, D. J., G. Hanes, and S. Heins-Miller. Infectious bursal disease viral RNA can be amplified using RT/PCR from bursa tissue following inactivation of the virus with phenol : chloroform. Avian Dis. 40:457-460. 1996.
3. Jackwood, D. J., and R. J. Jackwood. Infectious bursal disease viruses: molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. Avian Dis. 38:531-537. 1994.
4. Jackwood, D. J., and R. J. Jackwood. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. Avian Dis. 41:97-104. 1997.

5. Jackwood, D. H., and Y. M. Saif. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. Avian Dis. 31:766-770. 1987.
6. Kibenge, F. S. B., A. S. Dhillon, and R. G. Russell. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. J. Gen. Virol. 69:1757-1775. 1988.
7. Lee, L. H., S. L. Yu, and H. K. Shien. Detection of infectious bursal disease virus infection using the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 40:243-254. 1992.
8. Liu, H.-J., J. J. Giambrone, and T. Dormitorio. Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. J. Virol. Methods 48:281-291. 1994.
9. Lukert, P. D., and Y. M. Saif. Infectious bursal disease. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 721-738. 1997.
10. Okoye, J. O. A. Infectious bursal disease of chickens. Vet. Bull. 54:425-436. 1984.
11. Rosenberger, J. K., S. S. Cloud, J. Gelb, E. Odor, and J. E. Dohms. Sentinel bird survey of Delmarva broiler flocks. In: Proceedings of the 20th National Meeting on Poultry Health and Condemnations, Ocean City, Md. pp. 94-101. 1985.
12. Snyder, D. B., D. P. Lana, B. R. Cho, and W. W. Marquardt. Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. Avian Dis. 32:527-534. 1988.
13. Snyder, D. B., D. P. Lana, P. D. Savage, F. S. Yancey, S. A. Mengel, and W. W. Marquardt. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis. 32:535-539. 1988.
14. Wu, C. C., T. L. Lin, H. G. Zhang, V. S. Davis, and J. A. Boyle. Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. Avian Dis. 36:221-226. 1992.



الفصل الحادي والأربعون

فيروس بارفو الإوز (مرض ديرزي)
GOOSE PARVOVIRUS (DERZSY'S DISEASE)

ريتشارد إ. غوف
Richard E. Gough

الملخص Summary

يتسبب مرض ديرزي بفيروس بارفو تلقائي التكاثر. يمكن أن ينتج عن المرض ١٠٠٪ نفوق في الإوز الصغير والبط المسكوفي الصغير تحت ١٠ أيام من العمر. وجدت فروق معنوية بين مجينات معزولات الإوز والبط المسكوفي.

تعريف المسبب Agent Identification

يجرى تشخيص المرض بعزل الفيروس في أجنة بيض الإوز أو البط المسكوفي أو في مزارع الخلية المشتقة من هذه العوامل. يؤكد التعرف على الفيروسات المعزولة بالمجهر الإلكتروني واختبار تعادل الفيروس.

الكشف المصلي Serologic Detection in the Host

يجري عادة التأكيد المصلي بواسطة اختبارات التعادل الفيروسي أو الترسيب في الآجار. تتوافر اللقاحات لكل من الإوز والبط المسكوفي.

مقدمة Introduction

عدوى فيروس بارفو الإوز تسمى أيضاً مرض ديرزي أو التهاب الكبد في الإوز أو طاعون الإوز وهو مرض عالي الوبائية يصيب الإوز والبط المسكوفي الصغير. لم يسجل وجود هذا المرض بعيداً عن هذين النوعين من الطيور في أنواع الطيور الأخرى أو الثدييات. إن أول وصف لهذا المرض كان في الصين عام ١٩٥٦م، ولكن لم يتم تسجيل المرض من معظم مزارع الإوز والبط المسكوفي في البلاد المنتجة في العالم (2).

ترجع وبائيات المرض غالباً إلى الانتقال عن طريق البيض من أمهات التربية للإوز والبط المسكوفي كامنة الإصابة. تسبب هذه تمرير الإصابة للطيور القابلة للإصابة عند وقت الفقس أو بعد ذلك سريعاً. قد تصبح الطيور التي تقاوم العدوى حاملة للفيروس طوال حياتها.

ا رض الإكلينيكي Clinical Disease

تختلف الأعراض والإصابة والنفوق في الإوز والبط الصغير القابل للإصابة تبعاً لعمر الطيور وقت الإصابة. قد تصل نسبة النفوق إلى ١٠٠٪ في الإوز المصاب في المفقس مع ظهور الأعراض والنفوق من ٥ — ١٠ أيام بعد ذلك. قد تختلف فترة الحضانة والنفوق في الطيور عند عمر ٢ — ٣ أسابيع (6). بداية، تُظهر الطيور المريضة خمولاً وضعفاً مع عدم الميل للحركة وتحدث إفرازات من الأنف والعين في طيور عديدة مع اهتزاز الرأس. عادة تتضخم الغدة الزيتية وجفون العين وتكون حمراء مع إسهال أبيض شديد في عديد من الطيور. يوضح فحص الطيور عند هذه المرحلة وجود غشاء تليفي كاذب يغطي اللسان وتجويف الفم. قد تتحول الطيور التي تقاوم الحالة الحادة إلى مرض مزمن ويتميز بتأخر شديد في النمو وفقدان الزغب حول الرقبة والظهر واحمرار ملحوظ في الجلد العاري. قد تتراكم سوائل الاستسقاء في البطن والتي تجعل الإوز يقف في وضع طائر البطريق. الإوز والبط الصغير أكبر من أربعة أسابيع نادراً ما يوضح أعراضاً مرضية. في الحالة الحادة، تكون الآفات شائعة في القلب على شكل شحوب في عضلة القلب ويتميز باستدارة قمته. قد يتضخم الكبد والطحال والبنكرياس مع الاحتقان. قد توجد الآفات الأخرى المختلفة في حالة طول فترة المرض الالتهاب التليفي في الأغشية المصلية للكبد وغشاء التامور يكون موجوداً مع كمية كبيرة من سوائل بلون القش في تجويف البطن. قد توجد أيضاً أوديما الرئوية وتغيرات نخرية في الكبد والتهاب معوي. الأقل تكراراً هو إمكانية رؤية الأنزفة على الفخذ والعضلات الصدرية. قد تشاهد آفات دفتيرية تقرحية في الفم والبلعوم والمريء اعتماداً على وجود العدوى الثانوية.

نسيجياً، تكون الآفات الرئيسية عبارة عن تغيرات تدميرية واضحة في خلايا عضلات القلب (الطبقة العضلية) وخلايا الكبد مع التجويف أو ارتشاح أو تخلل دهني ووجود الاحتوائيات داخل الأنوية مبعثرة من النوع كاودراي A. تحدث تغيرات مشابهة في البنكرياس والكلية والطحال وبيرسا فايريسي والغدد التوتية.

ع العينات Sample Collection

في الحالة الحادة للمرض، يمكن جمع الزرق من الطيور المصابة لمحاولة العزل الفيروسي والإظهار بواسطة المجهر الإلكتروني النافذ. عند الفحص التشريحي المرضي يجب أخذ العينات من القلب والكبد والطحال والكلى. للعزل الفيروسي ويجب إرسال العينات عند ٤ ْم تقريباً في إناء محمي من الشرخ مع ثلج أو أي مبردات مناسبة

أخرى. عند التأخير لأكثر من يومين، يجب تجميد العينات قبل الإرسال. بقدر الإمكان بعد النفوق توضع العينات المناسبة خاصة الأعضاء أو الأنسجة التي بها آفات نوعية في ١٠٪ فورمالين منظم للفحص النسيجي. بسبب إمكانية انتقال فيروس بارفو رأسياً، يجب فحص الأجنة التي تنفق أثناء التحضين أو مباشرة بعد الفقس لوجود الفيروس. يمكن اكتشاف الأجسام المضادة في عينات الدم من البط والإوز اليافع ونسله. يمكن أن تجمع أيضاً عينات من الصفرة من البيض غير المخصب لتقييم الأجسام المضادة.

بيئات الزرع ا فضلة Preferred Culture Media

لمحاولة العزل الفيروسي يجهز معلق نسيجي ٢٠٪ في محلول ملح فوسفاتي منظم مع المضادات الحيوية ويحقن في أيٍّ من أجنة بيض الإوز أو البط المسكوفي أو مزارع الخلية المشتقة منهما.

الزرع أجنة البيض Culture in Embryonating Eggs

يمكن عزل الفيروس عقب الحقن في كيس الألنتويس لأجنة الإوز أو البط المسكوفي عند عمر ١٠ — ١٥ يوماً وتكون خالية من الأجسام المضادة لفيروس بارفو. بعد التحضين عند ٣٧ ْم يحدث عادة النفوق مع الأنزفة في الكبد والأنسجة خلال ٥ — ١٢ يوماً. يحدث بالتمرير الأكثر نفوق الأجنة بشكل ثابت وعادي بين ٤ - ٦ أيام بعد الحقن. يجب إجراء تمريرتين على الأقل قبل اعتبار محاولة عزل الفيروس سلبية.

مزارع ا لية Cell Culture

تكون مزارع الخلية الأولية لأجنة الإوز أو البط المسكوفي عند عمر ١٢ — ١٥ يوماً مناسبة لعزل فيروس البارفو. من الشائع مع فيروسات بارفو الشديات تسهيل العزل بحقن مزارع الخلية قبل أن تكون الطبقة الواحدة المندمجة، ويفضل عند وقت الزرع. ينتج الفيروس تأثيراً مرضياً خلوياً محدداً ٣ — ٥ أيام بعد الحقن، ومتكوناً من خلايا مستديرة منكسرة في الضوء. يتطور التأثير المرضي الخلوي إلى تدمير كامل لخلايا الطبقة الواحدة بعد ٦ — ٧ أيام.

تعريف ا سبب Agent Identification

الشكل ا ورفولوجي Morphology

فحص الزرق من الطيور المصابة أو الخامات الناتجة من الزرع بواسطة الفحص المباشر بالمجهر الإلكتروني غالباً يوضح جزيئات فيروس بارفو. يتراوح نصف قطر الفيروس المتماسك من ٢٠ - ٢٢ نانوميكروناً وهو لا يحتوي على غلاف وسداسي الشكل وله ٣٢ كابسومير محددة (2).

ا صائص الفيزيوكيميائية Physicochemical Properties

هذا الفيروس مقاوم جداً للإبطال الفيزيائي أو الكيميائي. لا يحدث فقد للإمراضية عقب التسخين عند ٦٥ °م لمدة ٣٠ دقيقة (2). وهو مقاوم للإيثير والكلوروفورم ويحتمل رقم حموضة ٣ لمدة ساعة عند ٣٧ °م تحت الظروف خارج جسم العائل، وتدمر الإمراضية عقب المعاملة بتركيز ٠,٥٪ من الفورمالدهايد (7).

التعرف ا زيئي Molecular Identification

فيروس بارفو له حامض نووي ديوكسي ريبوزي يتكون من حوالي ٥٦٠٠ قاعدة. تم التعرف على بروتينات عند منطقة ٩١ و ٧٨ و ٥٨ كيلودالتون باستخدام معزولات من البط المسكوفي وبروتين آخر عند ٥١ كيلودالتون (8). إن الجزيئات الفيروسية المعدية لها كثافة تقريبية ١,٣٨ جم/مل من كلوريد السيزيوم (5).

كشف الأنتيج Antigen Detection

يمكن اكتشاف الأنتيجين الفيروسي بواسطة التألق المناعي في الأحشاء خاصة الكبد من الإوز المصاب ومزارع الخلية (12). للأجسام المضادة الأولية، يحصل على جلوبيولين فيروس بارفو المضاد لمصل الإوز والمحضر في الإوز بالترسيب الثلاثي لمصل الإوز فائق المناعة باستخدام ٣٣٪ سلفات الأمونيوم. يحدد تركيز البروتين ويعلم جزء الجلوبيولونيات المناعية مع صبغة إيزوسيوسيانات الفلوروسين (FITC). عند تطبيقه على مسحات الطبع من الكبد أو الطحال من الإوز المصاب ومزارع الخلية المصابة تتألق أنوية الخلايا باللمعان.

أيضاً طور اختبار الإليزا الجاذب للأنتيجين لكشف أنتيجين فيروس بارفو في مزارع الخلية (4) والأنسجة من الإوز (11)، إلا أن هذه التقنيات لم تقرر بعد.

طورت تقنية الترسيب في الآجار لاكتشاف أنتيجينات فيروس بارفو في أنسجة الأجنة وسوائل الألنتويس من الأجنة المصابة (2). عقب حقن أجنة الإوز أو البط المسكوفي عند عمر ١٠ — ١٥ يوماً بالعينات المراد تشخيصها، يمكن أن تفحص الأجنة التي تموت لوجود الأنتيجين. تجمع الأجنة النافقة وسوائل الألنتويس والأمنيون، وتزال رؤوس وأطراف الأجنة، وتعلق في السوائل الجنينية بنسبة ٢٠٪ (وزن/ حجم). بعد التجانس يخلط المعلق مع حجم مساوي من ثلاثي كلوريد ثلاثي فلور إيثان trichlorotrifluorethane (Arcton 113, ICI, London, United Kingdom) لمدة ٣٠ دقيقة ويعقبها الطرد المركزي عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٥ دقيقة. يؤخذ السائل الرائق لطرد مركزي أكبر عند ٤٦٠٠٠ إكس جي لمدة ساعتين عند ٤ °م. تعليق الراسب الناتج يعاد في حجم قليل من الماء منزوع الأيونات ويعامل بكمية ٠,١٪ لورايل ساركوسينات N-lauroylsarcosine (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.). تجهز أطباق الآجار باستعمال ١٪ آجار رقم ٢ (Oxoid, distr. Unipath, Ogdensburg, N.Y.) في ٨٪ محلول كلوريد

الصوديوم بي إتش ٧,٨. يخرم الآجار بالشكل القياسي المعروف (الشكل السداسي) وتوضع كميات صغيرة من المصل المضاد المرسِّب لفيروسات بارفو الإيجابي في حفر على جانبي الأنتيجين مع الأنتيجين الضابط المعلوم في الحفرة المركزية. يحدث الانتشار عند ٢٠ - ٢٢ °م وتفحص الأطباق لخطوط الترسيب بعد حوالي ٢٤ ساعة تقريباً. تسجل النتائج الإيجابية عندما يكون خط الترسيب بين الحفر الضابطة الإيجابية متصلاً مع الخط بين الأنتيجين المختبر.

التقنيات ا ناعية Immunologic Techniques

يمكن استخدام اختبارات التعادل في مزارع خلية الإوز أو البط المسكوفي أو أجنة البيض باستخدام مضادات مصلية أحادية التخصص لفيروس بارفو للتعرف على الفيروس المعزول. وصفت طرق أخرى وتشمل اختبار تناقص البقع (13) وتحليل منع تلازن الحيوانات المنوية (10)، لكن لم تقيم هذه التقنيات كاملة.

الكشف ا صلي العائل Serologic Detection in the Host

تفيد الاختبارات المصلية في تقييم الحالة المناعية لقطعان الأمهات للإوز والبط المسكوفي والنسل الناتج. إن غياب أو وجود الأجسام المضادة للفيروس في أمهات الإوز يستطيع أن يحدد قابلية أو عرضة النسل للإصابة. يفيد أيضاً الفحص المصلي كوسيلة تشخيصية في تأكيد الوبائيات الحديثة للمرض في الإوز والبط المسكوفي. يعطي أيضاً ظهور الأجسام المضادة المشتقة من المح في البيض معلومات على مستوى المناعة أو الأجسام المضادة الأمية للنتاج.

اختبار تعادل الف وس Virus-Neutralization (VN) Test

يمكن إجراؤه في بيض أجنة الإوز أو البط المسكوفي أو مزارع الخلية الأولية المشتقة منهما. تم تطوير معزولة فيروس بارفو الإوز المتأقلمة للنمو في بيض اجنة البط البكيني أو (خاكي كامبل) لاختبار تعادل الفيروس (1). من الأفضل أن يتم إجراء الاختبار باستعمال فيروس ثابت ومصل متغير أو مخفف (طريقة بيتا). تتفاعل تخفيفات الأمصال المعاملة حرارياً (٥٦ °م لمدة ٣٠ دقيقة) مع ٦ — ٦٠٠ TCD_{50} أو EID_{50} من الفيروس، وبعد ساعة عند ٣٧ °م تحقن أنظمة الزرع المختلفة حسب الطريقة المستعملة بمخلوط تخفيف المصل والفيروس. بعد ٧ أيام يعبر عن مستويات الأجسام المضادة باللوغاريتم الثاني log_2 لمقلوب أعلى تخفيف من المصل الذي يحدث تعادلاً كاملاً للفيروس. معيار ٤ (١ : ١٦) أو أكبر يعتبر إيجابياً للأجسام المضادة لفيروس بارفو الإوز.

اختبار الترسيب الآجار Agar-Gel Precipitin Test

على الرغم من أنه أقل حساسية من اختبار التعادل، فإن هذا الاختبار يمثل طريقة مفيدة في اختبار أعداد كبيرة من الأمصال سريعاً لوجود الأجسام المضادة لفيروس بارفو الإوز (1). يستخلص الأنتيجين ويركز من أجنة البط المصابة عقب الإعداد أو حقنها بفيروس بارفو المتأقلم على أجنة بيض البط. تجرى الاختبارات في أطباق الآجار التي تحتوي على ١٪ آجار رقم ٢ أو آجاروز في ٨٪ محلول ملح عند رقم حموضة ٧,٨. يحدث الانتشار عند درجة حرارة الغرفة وتفحص الأطباق لخطوط الترسيب بعد ٢٤ ساعة. الأمصال المسجلة على أنها إيجابية يمكن أن تخفف بالمتسلسل المزدوج أو الثنائي لتحديد معيار الأجسام المضادة.

الاختبارات ا صلية الأخرى Other Serologic Tests

تم تطوير الإليزا لاكتشاف الأجسام المضادة لفيروس بارفو في كلٍّ من الإوز أو البط المسكوفي (2). طورت الإليزا المحاصرة والتي تضم الجلوبيولينات المناعية IgG الخاصة بالإوز والمضادة لفيروس بارفو الإوز وتم مقارنتها بالاختبارات المصلية الأخرى (4). أوضحت النتائج أنها طريقة سريعة ومعبرة وسهلة الإجراء ومرتبطة جيداً مع اختبار تعادل الفيروس. المشكلة التي تحدث جراء استخدام هذا الاختبار عند استعمال إوز غير خالي من المسببات المرضية لإنتاج المصل والجلوبيولين المناعي G للاستعمال في الإليزا.

التفريق من العوامل ا مرضة قريبة الصلة Differentiation from Closely Related Agents

سابقاً، اُعتقد أن فيروسات بارفو من الإوز والبط المسكوفي نشأت لأنهما قريبي الصلة أنتيجينياً، إلا أنه عقب انشقاق أكثر من عترة ضارية من فيروس البط المسكوفي أوضحت الدراسات التي تستخدم تعادل الفيروس والقصر الإنزيمي الطرفي فروقاً معنوية بين معزولات الإوز والبط المسكوفي (3, 14).

طور مسبار الحمض النووي الديوكسي ريبوزي والملصق بمادة ديجوكسيجينين (digoxigenin) لاكتشاف فيروس بارفو البط المسكوفي. ثبت أن هذا التحليل حساساً لكشف عترات فيروس بارفو وتفريق المعزولات عن العترات المشتقة من اللقاح (9). الفيروسات المصاحبة لفيروسات أدينو الطيور هي فيروسات بارفو النافقة والتي قد تصاحب مع الإصابة بفيروسات أدينو. في غياب فيروس أدينو المساعد لا تستطيع فيروسات بارفو هذه أن تتكاثر تحت الظروف خارج الجسم الحي.

توجد ممرضات قليلة جداً في الإوز والبط المسكوفي التي تظهر الارتباط الشديد بالعمر لمرض ديرزي. يحدث فيروس هيربس البط التهاب معوي فيروس مسبباً نفوقاً مرتفعاً في الإوز والبط في كل الأعمار. يستطيع عزل وتعريف الفيروس المسبب أن يفرق بوضوح فيروس بارفو الإوز. يسبب أيضاً فيروس الالتهاب الكبدي في البط

أمراضاً قاتلة في البط تحت عمر ستة أسابيع ، إلا أن هذه الفيروسات تكون غير ممرضة للإوز والبط المسكوفي. تحدث الإصابة بالالتهاب الكلوي والمعوي النزفي في الإوز (HNEG) من عمر ٤ - ٢٠ أسبوعاً. سجل هذا المرض لأول مرة من مناطق معينة في فرنسا عام ١٩٧٠م وأُرجع على أنه شكل متأخر من مرض ديرزي ، وفي الحاضر لم تعزل عوامل ممرضة من حالات HNEG وفشلت نتائج دراسات الحماية في تأكيد العلاقة مع فيروس بارفو الإوز. وصف مرض في البط المسكوفي عند عمر ٢ –٨ أسابيع وسمي مرض فيروس K في البط المسكوفي. يعتقد أن العامل المسبب فيروس ريو ولا يسبب مرض في الإوز.

قد تسبب أيضاً ميكروبات باستيريللا أناتيبيستفر وباستيريللا ملتوسيدا نفوقاً عالياً في الإوز والبط المسكوفي. يمكن التفريق عن فيروس بارفو الإوز من خلال العلاج بالمضادات الحيوية المناسبة والزرع للعامل المسبب في بيئة مناسبة.

References المراجع

1. Gough, R. E. Application of the agar gel precipitin and virus neutralization tests to the serological study of goose parvovirus. Avian Pathol. 13:501-509. 1984.
2. Gough, R. E. Goose Parvovirus. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 777-783. 1997.
3. Jestin, V., M.-O. Le Bras, M. Cherbonnel, G. Le Gall, and G. Bennejean. Demonstration of very pathogenic parvoviruses (Derzsy's disease virus) in Muscovy duck farms. Reel. Med. Vet. 167:849-857. 1991.
4. Kardi, V., and E. Szegletes. Use of ELISA procedures for the detection of Derzsy's disease virus of geese and of antibodies produced against it. Avian Pathol. 25:25-34. 1996.
5. Kisary, J. Bouyant density of goose parvovirus strain B. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 23:205-207. 1976.
6. Kisary, J. Diagnosis and control of parvovirus infection of geese (Derzsy's disease). In: Acute virus infections of poultry. J. B. McFerran and M. S. McNulty, eds. For the Commission of the European Communities. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 239-242. 1986.
7. Kisary, J. Derzsy's disease of geese. In: Virus infections of birds. J. B. McFerran and M. S. McNulty, eds. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands, pp. 157-162. 1993.
8. Le Gall-Recule, G., and V. Jestin. Biochemical and genomic characterization of Muscovy duck parvovirus. Arch. Virol. 139:121-131. 1994.
9. Le Gall-Recule, G., and V. Jestin. A digoxigenin-labelled DNA probe for the detection of Muscovy duck parvovirus. In: New and evolving virus diseases of poultry. M. S. McNulty and J. B. McFerran, eds. European Commission in Brussels, December 15-16, 1992. CEC, Brussels, Belgium, pp. 157-166. 1994.
10. Malkinson, M., B. A. Peleg, N. Ron, and E. Kalmar. The assay of gosling hepatitis virus and antibody by sperm agglutination and sperm agglutination-inhibition. Avian Pathol. 3:201-209. 1974.
11. Roszkowski, J., P. Gazdzinski, W. Kozaczynski, and M. Bartoszcze. Application of the immunoperoxidase technique for the detection of Derzsy's disease virus antigen in cell culture and goslings. Avian Pathol. 11:571-578. 1982.
12. Schettler, C. H. Virus hepatitis of geese: 3. Properties of the causal agent. Avian Pathol. 2:179-193. 1973.
13. Takehara, K., K. Hyakutake, T. Imamura, K. Mutoh, and M. Yoshimura. Isolation, identification and plaque titration of parvovirus from Muscovy ducks in Japan. Avian Dis. 38:810-815. 1994.
14. Zadori, Z., J. Erdei, J. Nagy, and J. Kisary. Characteristics of the genome of goose parvovirus. Avian Pathol. 23:359-364. 1994.



الطرق المعملية القياسية

STANDARD LABORATORY PROCEDURES



طرق زراعة الخلية

CELL–CULTURE METHODS

كاريل أ. شات، وهـ. غراهام بورتشاس
Karel A. Schat and H. Graham Purchase

الملخص Summary

تستخدم مزارع الخلية تقليدياً للعزل والتعرف وتنمية الفيروسات. يتطلب الاستخدام الناجح لمزارع الخلية لتقنيات مناسبة لتجهيز وتعقيم الأدوات الزجاجية. تستخدم العديد من أنواع تكوينات الأوساط لنمو الخلايا خارج الجسم الحي. في هذا الفصل تم الوصف المفصل لتقنيات تجهيز وحفظ المزارع الأولية والثانوية باستخدام الخلايا الليفية لأجنة بيض الدجاج وخلايا كلى الدجاج وخلايا كلى أجنة الدجاج والخلايا الليمفاوية، بالإضافة إلى شرح مختصر لتجهيز خلايا أوتار أجنة الدجاج والخلايا الطلائية المعوية. يناقش في هذا الفصل تطبيق مزارع الخلية للفحوصات الفيروسية.

المقدمة Introduction

تستخدم مزارع الخلية تقليدياً في المعامل التشخيصية للعزل والتعرف وإكثار الفيروسات والكوكسيديا ولكشف الأجسام المضادة المعادلة للفيروس. مزارع الخلية لها عدة ميزات عن الحيوانات وأجنة البيض المستخدمة لمثل هذه الأغراض، وهي اقتصادية ونوع الخلايا بها متجانس نسبياً وخالي من التأثيرات المناعية والهرمونية التي قد تؤثر على تكاثر الفيروس. يمكن أن تحفظ الأنواع المتعددة من الخلايا في النيتروجين السائل ومن ثم تتوافر بسهولة، بالإضافة إلى الميزات الحديثة في الاستنساخ وتتابع الأحماض النووية وتعبير الناقلات الخلوية في الطيور وعوامل النمو مما يتيح تطوير مزارع الخلية باستخدام أنواع خلوية متخصصة والتي لا يمكن أن تنمو باستعمال الطرق المعتادة. استخدام الخامات الخالية من المسببات المرضية يكون أساسياً للتنمية الناجحة للخلايا والاستعمال التالي لعزل الفيروس. أحياناً قد يستخدم البيض غير الخالي من المسسببات المرضية لزراعة الخلية لوسائل العزل الفيروسي المباشر.

يدخل عدد كبير من العمليات المتلاحقة في زراعة الخلية لأن تقنيات التعقيم تكون غاية في الأهمية حتى في وجود المضادات الحيوية. يمكن أن تخفض أخطار التلوث بشدة باستخدام كبائن الزرع المعقمة. حتى هذه يمكن عمل زراعة الخلية بصورة مرضية أو كافية في غرفة نظيفة جيدة الإضاءة حيث تتضائل الأتربة والتيارات الهوائية. تعتبر التقنية المعقمة والسرعة ومهارة الفني عوامل مهمة جداً تحت هذه الظروف، ويعطي Freshney (4) و Versteeg (7) معلومات إضافية على مزارع الخلية.

أدوات ا عمل Laboratory Equipment

في حالة ضرورة تحضير أوساط ومحاليل المزرعة في المعمل في أدوات زجاجية يعاد استعمالها فإنه يجب توافر مصدر كبير للماء النقي. يجب أن يكون الماء خالياً من الأيونات مزدوجة التقطير أو كلاهما لإزالة كل بقايا المواد العضوية وغير العضوية السامة للخلية. يستعمل عادة الضغط الأسموزي العكسي reverse osmosis (RO) ويتبعه التقطير الزجاجي. يجب حفظ الماء النقي ونقله في أواني زجاجية أو مبطنة بالزجاج.

عموماً تزرع الخلايا في أطباق بتري زجاجية أو قوارير أو زجاجات أسطوانية خاصة المبطنة لمزرعة الخلية. لا يمكن استخدام الأطباق البلاستيكية المعدة للاستخدام البكتيريولوجي لمزارع الخلية. تعقم الأوعية البلاستيكية بعد الاستخدام بالأوتوكلاف وتستبعد، ومن المحتمل إعادة تصنيع البلاستيك المستخدم بالطريقة التالية :

١) عقم البلاستيكيات المستخدمة لمدة ١٦ ساعة في ٢٪ هيبوكلورايت الصوديوم أو في فرن ميكروويف لمدة ١٠ دقائق.

٢) اغسل ست مرات على الأقل في ماء الصنبور.

٣) صفِّ واغسل ست مرات في ماء مقطر.

٤) صفِّ وجفف في حضان عند ٤٨ °م.

٥) عقم الخامات البلاستيكية في فرن ميكروويف منزلي (٢,٤٥ ميجاهيرتز) لمدة ٣ — ٦ دقائق. ضع الكأس مع ٢٥٠ — ٥٠٠ مل من الماء في فرن كمغطس حراري. من المهم تبريد الفرن بين المرات وأن تحفظ البلاستيكيات جافة. يمكن أن تكدس أطباق بتري لثلاث أدوار ويجب وضع القوارير معتدلة مع أغطية سائبة. قد يفضل تعقيم الأغطية منفصلة اعتماداً على جهة صناعة القوارير. تسمح هذه الطريقة باستعمال خامات مزرعة الخلية البلاستيكية ١٠ — ٣٠ مرة قبل أن تبدأ في التدهور.

على الرغم أن الأدوات الزجاجية تم إحلالها كثيراً بالبلاستيكيات، إلا أنه يمكن استعمال الأدوات الزجاجية لتنمية الخلايا لكن يكون الغسيل الجيد أساسياً. الطريقة العامة التالية يوصى بها في تحضير كل الأدوات الزجاجية المستعملة في مزرعة الخلية.

١) طهر كل الخامات الملوثة بالأوتوكلاف عند ٢٠ رطلاً لكل بوصة مربعة لمدة ٢٠ دقيقة.

٢) اغسل في ماء الصنبور لإزالة المواد الصلبة، عند الضرورة استخدم الفرشة. الأواني الزجاجية الجديدة (اختيارياً) أو الأواني الزجاجية شديدة التلوث يجب أن تغمر لمدة ١٢ ساعة في محلول تنظيف من حمض الكبريتيك ثنائي الكرومات. (أذب ١٢٠ جم من ثنائي كرومات الصوديوم في لتر ماء صنبور وأضف ١٦٠٠ مل من حمض الكبريتيك المركز. ضع الإناء في الماء المثلج البارد أثناء التحضير واستعمل زجاجيات آمنة وقفازات سميكة). يمكن أن تعالج السدادات المطاطية في هيدروكسيد الصوديوم ٠,٥ عياري.

٣) انقع الأجزاء الصغيرة في ماء ساخن بواقع ٧٥ مل لكل أربعة لترات من الماء لمدة ساعة على الأقل من Micro® (International Products Corp., Burlington, N.J.). ضع الزجاجات والقوارير والأجزاء الكبيرة الأخرى في ماء دافئ (٥٢ °م) في غسالة الزجاجيات التي تعمل بالموجات فوق الصوتية Micro®. ضع الماصات في حوامل بعد إزالة السدادات القطنية وضعها في غسالة زجاجيات كما تم سابقاً. يمكن أن تستبدل Micro® بالمطهرات القاعدية الأخرى التي لا تدمص على الزجاج.

٤) اشطف مرتين على الأقل بماء الصنبور ومرتين في الأسموزية العكسية أو الماء المزدوج التقطير. اغسل الماصات في شاطفات الماء البارد لثماني مرات على الأقل بماء الصنبور وتغمر بعد ذلك في الماء الأسموزي العكسي.

٥) اصرف الماء من كل الزجاجيات على أرفف أو في فرن تجفيف.

٦) ضع سدادات في الماصات ثم توضع في علبة معدنية وتعقم بالحرارة الجافة عند ١٦٠ °م لمدة ساعتين بعد وصول الفرن لدرجة الحرارة المذكورة. لف الأجزاء الصغيرة وعبئها. يمكن أن تعقم الخامات التي تذوب أو تحترق بالأوتوكلاف لمدة ٢٠ دقيقة. يوصى باستعمال الشريط الكاشف أو الأمبولات للتأكد من الحرارة المناسبة.

بالإضافة للزجاجيات المعتادة والأدوات التي توجد في معمل البكتيريولوجي، فإن المعدات الضرورية التي تشمل المجهر المقلوب وفي حالة زراعة الخلايا في أطباق أو أنابيب تفتح في الجو يجب توافر حضان توفر ٨٥٪ رطوبة نسبية و٣ — ٥٪ ثاني أكسيد الكربون. من المهم تنظيف الحضانات لمنع التلوث الظاهري لمناطق العمل والتي تلوث المزارع. يوصى بالتطهير الروتيني للحضان بسبب الرطوبة النسبية التي تشجع نمو الفطريات. لا يقبل المص عن طريق الفم ويستخدم إما المرشح الماصي المطاطي أو جهاز ماص كهربائي.

أوساط مزرعة ا لية وا اليل ا ركزة Cell-Culture Media and Stock Solutions

يمكن أن تستخدم العديد منها وتتكون جميعها من التركيب الأساسي التالي:

١) محلول ملح متزن.

٢) مصدر بروتين مثل المصل أو سوائل الأمنيون أو مشتقات بروتين مثل لاكتوز الزلال المتحلل أو شوربة فوسفات التربتوز أو أحماض أمينية.

٣) خليط مضادات حيوية للسيطرة على التلوث الميكروبي المفاجئ، إلا أن استخدام المضادات الحيوية ممنوع في خطوط الخلايا المستديمة لأنها قد تخفي المستوى المنخفض.

بالرغم من إمكانية شراء العديد من الأوساط تجارياً إلا أنه أحياناً يكون من السهل أو الضروري أن تحضر هذه المكونات بالإمكانيات المتاحة. من الأفضل استخدام ماء نقي وخامات خاصة لمزرعة الخلية.

اليل ا لح ا تزنة و لول ملح الفوسفات ا نظم

Balanced Salt Solutions (BSSs) and Phosphate-Buffered Saline (PBS)

محلول ملح المتزن هانك Hank's BSS (HBSS) وإيرلي Earle's (EBSS) هما الأكثر تكراراً في الاستخدام كأساسات لأوساط النمو (الجدول رقم ٤٢,١)، ووظيفتهما هي الحفاظ على درجة الأس الهيدروجيني الفسيولوجية (٧,٢ – ٧,٦) والضغط الأسموزي والإمداد بالماء والجلوكوز والأيونات غير العضوية المطلوبة لنشاط الأيض للخلية الطبيعية. تستخدم أيضاً غالباً لغسل الطعوم والخلايا الميتة من المزارع وذلك لإزالة الأوساط المحتوية على المصل قبل عملية الهضم بالتربسين ولتخفيف محاليل التربسين، إلا أنه عند استخدام الفيرسين (إديتا) كمعلق للخلايا فإن محلول ملح دلبيكو Dulbecco's BBS بدون أملاح الكالسيوم والمغنسيوم (محلول A (الجدول رقم ٤٢,١) يكون حتى لتر من الماء) يجب أن يستخدم لغسل الخلايا ولتخفيف الفيرسين.

عند إتمام تحضير المحاليل يجب أن يذاب كل ملح تماماً قبل إضافة الملح الآخر. الأفضل عند تحضير المحاليل المركزة A و B من هانك وإيرلي (الجدول رقم ٤٢,١) أن تكون مركزة ١٠ مرات ويمكن أن تعقم بالأوتوكلاف منفصلة وتبرد بعد ذلك وتخلط ببطء مع التقليب الثابت. البديل أنه يمكن أن تخلط كالسابق وتعقم بالترشيح وتحفظ مجمدة أو عند ٤ °م. للاستخدام يضاف جزء من محلول مركز ١٠ مرات إلى ٩ أجزاء من الماء ويعقم المحلول في النهاية إما بالترشيح أو بالأوتوكلاف. ينصح بإزالة الفينول الأحمر عند استخدام محاليل بي بي إس BBS و بي إس إس BSS في تحضير الخامات للصبغ المناعي الكيميائي النسيجي أو للبيولوجيا الجزيئية.

ا دول رقم (٤٢,١). ا كونات لتحض تركيز 1x من BSS و PBS.

ا لول	ا كون[A]	الكمية[B]			
		PBS	Dulbecco's BSS	Earle's BSS	Hank's BSS
A	ماء	٨٠٠	٨٠٠	٨٠٠	١٠٠
	كلوريد صوديوم	٨	٦,٨	٨	٨
	كلوريد بوتاسيوم	٠,٤	٠,٤	٠,٢	٠,٢
	سلفات ماغنسيوم	٠,٢	٠,٢	-	-
	فوسفات بوتاسيوم	٠,٠٦	-	٠,٢	٠,٢٦
	$Na_2HPO_4.2H_2O$	٠,٠٦	-	٠,١٤	٠,٥٧
	$NaH_2PO_4.H_2O$	-	٠,١٤	-	-
	جلوكوز	١	١	-	-
	فينول أحمر صوديوم	٠,١٧	٠,١٧	٠,١٧	٠,١٧
B	ماء	١٠٠	١٠٠	١٠٠	-
	كلوريد كالسيوم	٠,١٤	٠,٢	٠,١	-
C	ماء	١٠٠	١٠٠	١٠٠	-
	كلوريد ماغنسيوم	-	-	١	١,٨[c]
	$NaHCO_3$	٠,٣٥	٢,٢	-	-

[A] أضف محلول A إلى محلول B. عقم المحاليل A و B و C بالأوتوكلاف لمدة ١٠ دقائق. محلول C يمكن أن يعقم بالترشيح الضاغط. بعد التبريد يمكن خلط محاليل A و B و C. احذف محاليل B و C عند عدم الاحتياج لهذه المكونات. في هذه الحالة أضف ٢٠٠ مل من الماء إلى محلول A.

[B] كل الكميات بالجرام فيما عدا الماء فيكون بالميلليتر. استخدم ماء أقل من الموضح. بعد إضافة كل المكونات إلى المحلول أضف الماء للكمية المطلوبة. للمحاليل 10x استعمال الكميات بتركيز 10x فيما عدا الماء، يحذف محلول C من محاليل Hank و 10x Earle.

[C] أضف مباشرة إلى محلول A.

لول التربس   والف س Trypsin and Versene (TV) Solution

يمكن تحضير المحاليل المركزة حتى ٢,٥٪ للتربسين أو يحصل عليها تجارياً. تستخدم غالباً المحاليل التالية المركزة ١٠ مرات للتربسين والفيرسين لمزارع خلية الطيور والتي تحضر كالتالي. أذب لتراً من الماء المقطر زجاجياً بالترتيب التالي: ٨٥ جم كلوريد الصوديوم، و٠,٤ جم كلوريد البوتاسيوم، و١٠ جم جلوكوز، و٣,٥ جم $NaHCO_3$، و$١٠^٦$ وحدة من بنسللين ج صوديوم، و١ جم سلفات ستربتوميسين (انظر أعلى)، و٥ جرام تربسين ١ : ٢٥٠ (GIBCO-BRL)، و٢,٥ جم إديتا، و٢٠ مل من ٠,٥٪ محلول الفينول الأحمر (GIBCO-BRL). قلب لمدة

٢ - ٣ ساعات عند درجة حرارة الغرفة أو طوال الليل عند ٤ °م. لا يذوب كل التربسين في المحلول. الأجزاء غير الذائبة يمكن إزالتها بالطرد المركزي عند ١٨٠ إكس جي لمدة ٢٠ دقيقة أو بالترشيح خلال ١ — ٢,٥ سم Celite filter aid على قمع بوخنر Buchner. عقم المحلول (TV) بالترشيح. وزع إلى كميات ٥٠ — ١٠٠ مل وجمد عند -٢٠ °م. يستعمل المحلول (1x) (التركيزات النهائية: ٠,٠٥٪ تربسين و٠,٠٢٥٪ فيرسين) يخلط ١٠٠ مل من محلول 10x TV مع ٩٠٠ مل من ماء مقطر زجاجياً ومعقم. دفِّئ المحلول حتى ٣٧ °م قبل الاستعمال.

لول بيكربونات الصوديوم Sodium Bicarbonate

لتسهيل التحكم في درجة الأس الهيدروجيني، يحذف غالباً بيكربونات الصوديوم من محاليل الملح والأوساط ويضاف إلى الوسط قبل الاستعمال مباشرة. تستعمل التركيزات المختلفة من ١,٤٪ حتى ١٠٪. يستعمل محلول ١٠٪ في ماء مزدوج التقطير أو الماء المقطر عكسياً ويعقم بالترشيح تحت ضغط موجب يحول الأوتوكلاف (انظر الجدول رقم ٤٢,١) أو الترشيح تحت ضغط سالب بيكربونات الصوديوم إلى كربونات الصوديوم. الوسيلة البديلة باستخدام تركيزات متكافئة الجزيئات من كربونات صوديوم وبيكربونات صوديوم. احفظ عند درجة الغرفة في كميات صغيرة في أنابيب محكمة الغلق.

لول ا تعادل الأ ر Neutral Red Solution

يحضر محلول ١٪ من المتعادل الأحمر (GIBCO-BRL) في الماء ويعقم بالترشيح ويحفظ عند درجة الغرفة. يتوافر تجارياً محلول ٣٣٪ من GIBCO-BRL.

لول ا ضاد ا يوي Antibiotic Solution

تتوافر تجارياً محاليل المضاد الحيوي-المضاد الفطري من GIBCO-BRL. تحتوي هذه المحاليل على ١٠٠٠٠ وحدة دولية/مل من بنسيللين ج صوديوم، و١٠٠٠٠ميكروجرام/مل من سلفات ستربتوميسين، و٢٥ ميكروجرام/مل من أمفوتريسين B (Fungizone®, Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, N.J.) في محلول ملح. أضف ١ مل من هذا المحلول إلى ١٠٠ مل من الوسط. عند صعوبة الحصول عليها تجارياً فيمكن أن تحضر ذاتياً. في مثل هذه الحالة تذاب عبوات بنسللين ج صوديوم وسلفات داي هيدروستريتومايسين في الماء المقطر أو PBS لتوفر ١٠٠٠٠ وحدة و١٠٠٠٠ ميكروجرام على التوالي لكل ملليتر من المحلول المركز ويراعى أن تفتح العبوات بشكل معقم. يمكن أن تعقم بالترشيح في حالة عدم المعاملة بطريقة معقمة. يمكن أن يضاف أمفوتيرسين B أو فنجيزوين بمعدل ٢٥ ميكروجرام/مل. أمفوتيرسين غير ذائب ويجب أن يضاف بطريقة معقمة. يجب أن يحفظ المخلوط في أحجام مقننة

ويجمد، وللاستخدام يذاب ويضاف لكل الأوساط والمحاليل المستخدمة في مزرعة الخلية بمعدل ١ مل من المحلول المركز للمضادات الحيوية لكل ١٠٠ مل من الوسط. هذا يوفر تركيز نهائي ١٠٠ وحدة من البنسللين و١٠٠ ميكروجرام من ستربتوميسين و٠,٢٥ ميكروجرام من أمفوتريسين لكل ملليتر من الوسط. أحياناً تستخدم تركيزات أعلى. المحاليل المركزة من المضادات الحيوية لا يجب أن يكرر تجميدها وإذابتها. البديل للبنسللين ستربتوميسين هو سلفات جنتاميسين بمعدل ١٠ ميللجرام/مل، واستعمل ٠,١ مل لكل ١٠٠ مل من الوسط. لا يوصى باستعمال المضادات الحيوية للسيطرة على الميكوبلازما. الاختبار الجيد للمصل (انظر أسفل) هو استعمال خامات خالية من الممرضات النوعية للحصول على مزرعة خلية واستعمال مساعد الماصة يمنع التلوث بميكوبلازما الثدييات والطيور والإنسان.

زلال اللاكتوز ا تحلل Lactoalbumin Hydrolysate

تتوافر هذه البودرة تجارياً من Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. يحضر محلول زلال اللاكتوز عامة كتركيز 10x (٢,٥ وزن/ حجم) في محلول ملح هانك أو إيرلي بدون بيكربونات الصوديوم ويعقم بالأوتوكلاف ويحفظ عند درجة الغرفة. التركيزالنهائي في الوسط هو ١٠٪ من المحلول المركز أو ٠,٢٥٪ (وزن/حجم).

شوربة فوسفات التربتوز Tryptose Phosphate Broth (TPB)

تحضر شوربة فوسفات التربتوز (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) بإذابة ٢٩,٥ جم في لتر ماء، وتوزع وتعقم بالأوتوكلاف وتحفظ عند ٤ °م أو درجات الغرفة. تستخدم كمكون للأوساط خاصة لتكوين بؤرة بفيروس Rous sarcoma. هي أيضاً مادة جيدة لضبط التعقيم البكتريولوجي: أضف ١ — ٢ مل من أوساط الاختبار إلى ٥ مل من شوربة التربتوز وحضن عند ٣٧ °م لأكثر من أسبوع.

الآجار Agar

اعتماداً على استعمال محاليل ١,٦٪ - ٣٪ من الآجار البكتيري (GIBCO-BRL) يحضر في الماء. يذاب الآجار ويعقم بالأوتوكلاف لمدة ٢٠ دقيقة. بعد التبريد، يحفظ الآجار عند درجة الغرفة في أنابيب محكمة الغلق. مباشرة قبل الاستعمال يذاب الآجار في فرن ميكروويف أو بالغليان في حمام مائي وتترك حتى ٤٥ °م في حمام مائي. محلول الآجار يجب أن لا يكرر إذابته وصلابته وهو مناسب لمعظم الاستخدامات، لكن تكاثر الفيروسات يتوقف بوجود عديد السكريات الكبريتية الأنيونية. إضافة ١٠٠ ميكروجرام من ثنائي إيثيل أمينو إيثيل الدكستران لكل ملليتر من وسط الآجار أو استعمال آجار نوبل أو آجاروز يقلل هذه المشكلة.

الأمصال Sera

يستعمل مصل أجنة الأبقار (FBS) ومصل العجول ومصل الدجاج على الأغلب في تحضيرات مزارع خلية الطيور، إلا أن الأمصال من أنواع أخرى يمكن أن تستخدم بنجاح. مصل أجنة الأبقار والعجول هي الأفضل تجارياً بينما مصل الدجاج يمكن شراؤه تجارياً لكن اختباره لوجود فيروسات الطيور ليس كافيا دائماً. اقترحت الطريقة التالية في حالة وجوب تحضير المصل من الدم:

١) اجمع الدم من الأفراد المختلفة من نفس النوع فردياً واتركه ليتجلط تلقائياً.

٢) حضن الدم المتجلط عند ٣٧ْ م لمدة ساعتين وبعدها يمكن أن يحفظ طول الليل في٤ ْم.

٣) افصل المصل واطرد مركزياً عند ٢٠٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة لإزالة كرات الدم الحمراء.

٤) يمكن أن تجمع الأمصال الفردية لكن احفظ المجموعة منفصلة.

٥) يمكن أن يجمع المصل بطريقة معقمة أو يعقم بالترشيح على الرغم أنه يسد معظم المرشحات سريعاً (انظر الفقرة عن التعقيم).

يجب اختبار كل مجاميع الأمصال شاملة تلك المشتراة من مصادر تجارية لدعمها لنمو الخلية ولوجود الميكوبلازما. تعطى معظم مصادر الأمصال قارورة ١٠٠ مل من المصل من الكمية المشتراة لتسمح باختبارها قبل الشراء. الطريقة التالية معتمدة لاختبار دعم نمو الخلية:

١) جهز مزارع باستخدام 1x و 0.5x من العدد المنتظم من الخلايا.

٢) أجرِ تمريراً أو إعادة زرع عندما تكون المزارع مندمجة، ويفضل أن تتبع بإعادة زرع ثانوية. الفروق الكائنة بين مجاميع المصل قد لا تكون دليلاً حتى بعد التمريرة الثانوية. إنه من المهم اختبار مجاميع المصل على كل أنواع الخلايا المستخدمة.

يمكن أن يستخدم الوسط لأول دورة اختبار لاختبار الميكوبلازما (مزرعةالخلية تمثل تغذية ممتازة للميكوبلازما). تسمح الطريقة التالية باكتشاف معظم أنواع الميكوبلازما الملوثة الشائعة:

١) جهز وسط سائل (Fabricant's medium II) باستعمال شوربة (Difco) heart-infusion broth مزودة بمصل الخنازير ١٠٪، و١٠٪ مستخلص خميرة طازج (انظر أسفل)، و١٠٠٠ وحدة/مل من بنسللين ج صوديوم، و٠,١٪ خلات الثاليوم.

٢) تجهز الأطباق كالسابق لكن بإضافة آجار (Difco) heart-infusion بدلاً من الشوربة.

٣) احقن ٢ مل من العينة في أنبوبة مع ٢ مل من الوسط السائل.

٤) حضن لمدة ثلاثة أيام عند ٣٧ْ م، افرد ملء اللوب على مربع على الطبق، وحضن في إناء الشمعة مع جو رطب.

٥) افحص الطبق بعد ٦ أيام لوجود مستعمرات الميكوبلازما.

التحضير المناسب لمستخلص الخميرة يعتبر أساسياً ويجرى كالتالي :

١) سخن لتر من الماء حتى ٤٥ °م، وأضف ٢٥٠ جم خميرة مخبز حية، وقلب لمدة ١٥ دقيقة وبرد المعلق.

٢) اطرد مركزياً عند ١٦٠٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة.

٣) رشح الرائق خلال ورق ترشيح وعقم في الأوتوكلاف في زجاجات أو أنابيب.

٤) احفظ المستخلص عند —٢٠ °م حتى الحاجة للاستخدام.

بدلاً من استعمال هذه الطريقة، من الممكن أيضاً اختبار السوائل الرائقة باختبار تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام البوادئ المناسبة، لكن قد تفقد هذه الطريقة بعض أنواع الميكوبلازما.

مستخلص أجنة الدجاج Chicken Embryo Extract

يفضل أجنة دجاج خالية من الممرضات النوعية عمرها ٨ — ١٠ أيام. بعد التخلص من العيون، اهرس الأجنة ببعضها خلال محقن وإبرة مقاس ١٨ — ٢٠ في قارورة تحتوي على حجم مساوي من محلول ملح الفوسفات. يحفظ المعلق طوال الليل عند —٢٠ °م، ويذاب عند ذلك ويطرد مركزياً لمدة ١٥ دقيقة عند ٥٠٠ إكس جي واحفظ الرائق. يمكن أن تكرر هذه العملية مرتين. بعد الطرد المركزي النهائي، احفظ الرائق عند —٢٠ °م.

التعقيم Sterilization

العديد من المكونات وأحياناً الوسط الكامل يمكن أن تشترى معقمة. يمكن أن تعقم بعض المحاليل بالأوتوكلاف، على سبيل المثال محلول ملح الفوسفات والآجار ومحلول الفيرسين ومحلول الأحمر المتعادل وشوربة فوسفات التربتوز وزلال اللاكتوز المتحلل والماء المقطر، إلا أن الأوساط المحتوية على مكونات غير ثابتة حرارياً مثل الأحماض الأمينية أو المضادات الحيوية أو المصل أو التربسين لا يمكن تعقيمها بالأوتوكلاف ويجب أن تعقم بالترشيح. الترشيح الضاغط خلال مرشحات غشائية باتباع الطرق الموصى بها بواسطة المصنع (Millipore Corp., Bedford, Mass. or Gelman Sciences, Ann Arbor, Mich.). عادة يكون المرشح المفرد المعقم كافياً لترشيح محاليل غير المصل أو التربسين. يوصى بالمرشحات الخاصة وحوامل المرشح لترشيح منتجات المصل وهي متوفرة من (Gelman, Millipore).

أوساط ا زرعة Culture Media

يجب أن تمد أوساط مزرعة الخلية الخلايا بالمغذيات الضرورية والظروف المناسبة للأيض الطبيعي. بعض الأوساط مثل M-199 و RPMI-1640 مركبة وتحتوي من ٥٠ — ١٠٠ مكوناً ويكون من الأفضل شراؤها

(إما على شكل مركز 10x أو على شكل بودرة). الأوساط الأبسط مثل محلول إيرلي (Earle's BSS) مع متحلل زلال اللاكتوز تكون سهلة التحضير في المعمل. اختيار الوسط والكمية ومصدر المصل المضافة إلى الوسط يعتمد على عدد من العوامل مثل احتياجات الخلية والاستخدام المحدد لمزارع الخلية وسعر وتوفر مكونات الأوساط والأمصال. تضاف الفيتامينات الإضافية والأحماض الأمينية (خاصة جلوتامين L) ومستخلص جنين الدجاج غالباً لتحسين النمو. إضافة ١٠٪ شوربة فوسفات التربتوز يسهل تحول الخلايا بواسطة فيروسات راوس ساركوما. الجدول رقم (٤٢,٢) يعطي أمثلة لتكوينات الأوساط المستعملة في العديد في معامل البحث.

يعطي الجدول رقم (٤٢,٣) المكونات لآجار التغطية. التركيز النهائي للآجار ٠,٨ — ١٪ يعطي هلاماً محكماً ويمكن أن تستخدم لاختبار الفيروسات والمزارع طويلة المدة. يوصي بآجار التغطية ١,٥٪ للاستنساخ أو رؤية البقع الفيروسية بالمتعادل الأحمر. عند الحاجة لإزالة الأغطية المنزلقة من تحت الآجار يمكن استخدام آجار لين يحتوي على ٠,٤ — ٠,٦٪ آجار. لاحظ أن المكونات لا يمكن أن تخلط وتذاب بعد ذلك بسبب تجلط المصل. يذاب الآجار في ميكروويف ويبرد حتى ٤٢ — ٤٥ °م في حمام مائي. جهز وسط 2x ويدفأ حتى ٣٧ — ٤٢ °م، واخلط الجزأين وأضفه للمزرعة. الحرارة النهائية لوسط الآجار سوف تهبط بسرعة خفيفة ولا تسبب دماراً للخلايا.

ضـ مزارع ا لية Preparation of Cell Cultures

يشمل التجهيز إزالة الأعضاء بشكل معقم من الحيوان حديث القتل أو من أجنة البيض. تقطع الأعضاء ميكانيكياً إلى أجزاء صغيرة، وتغسل لإزالة كرات الدم الحمراء وتنتشر إلى معلق خلايا مفردة بالهضم الإنزيمي بالتربسين. تغسل الخلايا لإزالة التربسين وتعلق في وسط النمو وتعد وتوضع في أوعية مزرعة الخلية المناسبة ثم توضع في حضانة ويسمح للخلايا بالنمو. لوسائل العد المستخدمة يوصى بالآتي.

مزارع ا لية الليفية لأجنة الدجاج Chick Embryo Fibroblast (CEF) Cultures

هذه الطريقة يمكن أن تستخدم لمزارع خلية الجنين في العديد من الأنواع المختلفة. تستخدم الأجنة عند حوالي منتصف فترة التحضين (٩ — ١١ يوماً لأجنة الدجاج).

ا دول رفم (٤٢,٢). مكونات أوساط مزرعة ا لية شائعة الاستخدام[A].

الرفم	اسم الوسط	ا كونات	الكمية
1	M20[B]	10x و M-199	٩٠ مل
		شوربة فوسفات تربتوز	١٠٠ مل
		بيكربونات الصوديوم ١٠٪	٦,٣ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	حتى ١٠٠٠ مل
2	F10-199[c]	بودرة M199	٤,٥ جم
		بودرة Ham's F10	٥,٥ جم
		شوربة فوسفات تربتوز	٧,٥ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	حتى ١٠٠٠ مل
3	Leib-McCoy[c]	بودرة ليبوفيتس L-15	٨,٧٦ جم
		بودرة McCoy's 5A معدلة	٥ جم
		بيكربونات الصوديوم	٠,٩٤ جم
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	حتى ١٠٠٠ مل
4	LH[D]	متحلل زلال اللاكتوز 10x	١٠٠ مل
		محلول ملح هانك 10x	٩٠ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	٨٠٠ مل
		بيكربونات صوديوم لضبط pH ٧,٣ – ٧,٥	-
5	BME[E]	بودرة BME	٩,١٨ جم
		شوربة فوسفات تربتوز	٣,٤٨ مل
		بيكربونات الصوديوم	١,٠٤ جم
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		محلول بيكربونات صوديوم لضبط pH ٧,٣ – ٧,٥	-
6	LMH[F]	1x Leibovitz's L-15	٣٨٥ مل
		1x بمعدل McCoy's 5	٣٨٥ مل
		بيكربونات الصوديوم ١٠٪	٢ مل
		شوربة فوسفات تربتوز	٥٠ مل
		2-Mercaptoethanol, 1 mM	١٠ مل
		بيروفات الصوديوم 100x	١٠ مل

تابع الجدول رقم (٤٢,٢).

محلول جلوتامين ٢٠٠ مللي مول	١٠ مل
خليط مضادات حيوية	١٠ مل
مصل دجاج	١٠٠ مل
مصل دم أجنة الأبقار FBS	٨٠ مل

[A] gs = كمية كافية، BSS = محلول ملح متزن، BME + وسط أساسي إيجل، FBS = مصل أجنة الأبقار، CK = كلية الدجاج، CFE = الخلايا الليفية لجنين الدجاج.

[B] M20 مزودة بـ ٥٪ FBS (M25) تستخدم كوسط نمو لخلايا CK.

M20 مزودة بـ ٢ ٪ FBS (M22) تستخدم كوسط نمو لـ CEF.

وسط حفظ يحتوي ٠,٢٥٪ FBS (M20.25).

[C] F10-199 و Leib-McCoy مزودة بـ ٤٪ مصل عجول تستخدم كوسط نمو لخلايا جنين الدجاج الليفية وCEF. لوسط حفظ أضف مصل عجل ١٪. حالياً نحن نستخدم F10-199 مع ٠,٢٥٪ مصل أجنة أبقار كوسط حفظ لخلايا CK.

[D] LH مزودة بـ ١٠٪ مصل عجول تستخدم كوسط نمو لخلايا CEF. وسط حفظ يحتوي ٢٪ مصل عجول.

[E] BME مزودة بـ ٥٪ FBS تستخدم كوسط نمو لخلايا CK. وسط حفظ يحتوي ١٪ FBS.

[F] LMH تستخدم لزراعة خطوط الخلايا للخلايا الليمفاوية والخلايا الليمفاوية النخاعية. RPMI-1640 يمكن أن تستخدم للإحلال مكان McCoy و Leibovitz. تحتاج خطوط خلايا معينة مصلاً أقل.

١) افحص مجموعة من أجنة بيض الدجاج عمر ٩ — ١١ يوماً لحيويتها.

٢) نظف سطح القشرة بالغمس في كحول لمدة ٥ دقائق أو بمسحها بصبغة اليود. لا تستعمل بيضاً ملوثاً أو متسخاً.

٣) احمل البيض بعد ارتداء القفاز واترك الكحول الزائد يصفى، واقطع حول القشرة تحت غرفة الهواء، وانزع هذا الجزء. احصل على الجنين بوضع ملقط رباعي السنون تحت عنقه واسحبه بحرص حتى يتحرر من كيس المح. لا تستعمل الأجنة الملوثة بالمح لأنه سام للخلايا.

٤) احمل الجنين فوق قارورة الهضم بالتربسين واقطع الرأس خارجاً حتى يسقط الجسم داخل القارورة. يمكن أيضاً أن يوضع الجنين في كأس ويقطع بالمقص. يمكن التخلص من العيون والأطراف والأحشاء قبل التقطيع. يعطي هذا خلايا أولية أكثر تجانساً لكنه أكثر إجهاداً.

٥) انقل الأنسجة المهروسة إلى قارورة التربسين أوإيرلينماير (Erlenmeyer). اغسل بإضافة ٣ مل محلول ملح فسيولوجي معقم لكل جنين وقلّب واترك القطع لترسب وتخلص من السوائل الرائقة. كرر الغسيل حتى يكون السائل صافياً وخالياً من الدم واسكب عندئذ محلول ملح فسيولوجي معقم بقدر الإمكان.

ا دول رقم (٤٢,٣). مكونات أوساط آجار التغطية (Agar Overlay Media).

الرقم	اسم الوسط	ا كونات	الكمية
1	2x M20[B]	10x و M-199	٩٠ مل
		شوربة فوسفات تربتوز	٥٠ مل
		بيكربونات الصوديوم ١٠٪	٦,٣ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	حتى ٤٠٠ مل
		آجار ٢٪	٤٠٠ مل
2	2x LH	محلول 2x Earle يحتوي ١,٣٪ من متحلل زلال اللاكتوز	٥٠٠ مل
		١٪ محلول المتعادل الأحمر	١٠ مل
		آجار ١,٦ – ٣٪	٤٨٠ مل
3	2x F10-199	M199 2x	٢٢٥ مل
		وسط 2x F10 Ham	٢٢٥ مل
		شوربة فوسفات تربتوز	٥٠ مل
		مصل عجول	٥٠ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		بيكربونات صوديوم ٧,٥٪ (كمية كافية لضبط pH حتى ٧,٣ – ٧,٥)	
		آجار ١,٦٪	٤٥٠ مل

[A] يذاب الآجار ويبرد حتى ٤٢ – ٤٥ °م، يدفئ الوسط 2x حتى ٤٢ °م ويخلط الجزئين.

[B] يمكن أن تستخدم مع أو بدون مصل.

[C] يستخدم المتعادل الأحمر لصبغ المزارع المصابة بالعوامل الممرضة الخلوية. تصبغ الخلايا الحية باللون أحمر ولا تصبغ الخلايا الميتة (البقع أو plaques).

٦) أضف ٤٠ - ٥٠ مل من محلول تربسين فيرسين الذي سبق تسخينه عند ٣٧ °م مع الهز المتقطع أو استخدم مقلباً مغناطيسياً. بعد ٥ دقائق اترك القطع تترسب وتخلص من الرائق بحرص خلال طبقتين من شاش معقم في كأس. انقل المعلق إلى قوارير طرد مركزي كبيرة تحتوي على ٥٪ (حجم/حجم) من مصل العجول أو مصل أجنة الأبقار وتوضع على حمام ثلجي لمدة ٥ دقائق على الأقل. إذا لم تقطع الأجنة بالمقص، تمزق الأجنة في محلول ملح فسيولوجي معقم بترك عمود التقليب يدور بسرعة متوسطة وتغسل مرة بمحلول تربسين فيرسين قبل الهضم بالتربسين.

٧) كرر الطريقة ثلاث إلى أربع مرات حتى يترك فقط الأنسجة الليفية البيضاء ولا يكون المزيد من بقايا الخلايا بمعنى أن يكون التربسين صافياً تقريباً. اخلط المعلقات الخلوية المجموعة من كل عمليات التربسين. البديل هو إجراء عملية التربسين ٣ – ٤ مرات، ويحتمل أن يجرى لمرة واحدة لمدة ساعة، واستعمل ٢٠ مل من محلول

تربسين-فيرسين لكل جنين وحضن لمدة ساعة عند ٢٥°م أو ٣٧°م مع تقليب ثابت. اجمع الخلايا كما سبق وصفه.

٨) اطرد مركزياً لعشرة دقائق عند ٣٥٠ إكس جي. إعادة الطرد المركزي تكون اختيارية. تخلص من التربسين.

٩) أضف ١٠٠ مل من وسط النمو (الجدول رقم ٤٢,٢) لكل ملليتر من الخلايا المعبأة وقلب الخلايا المرسبة بالشفط المتكرر الهادئ بالماصة أو بهدوء مستخدماً هزاز.

١٠) احسب حاصل الخلايا. المعلق ١٪ من الخلايا المعبأة كما وصف سابقاً يحتوي حوالي ٢ x ١٠^٦ خلية/مل. يحتاج الإحصاء الدقيق لعدد الخلايا الحية إلى استعمال جهاز عد خلايا الدم ومجهر. تشمل الطريقة الأخيرة نقل ١ مل من معلق الخلايا إلى أنبوبة، وأضف نقطة من صبغة التريبان الأزرق ١٪ واخلط جيداً. لأفضل نتائج حضن الخلايا مع الصبغة لمدة خمس دقائق عند درجة حرارة الغرفة. الخلايا زرقاء الصبغة تكون ميتة وعديمة الصبغة تكون حية. عد كل الخلايا عديمة الصبغة، والخلايا المزدوجة والثلاثية والمتجمعة تعد على أنها خلية واحدة، ويجب أن يحتوي المعلق على أكثر من ٩٥٪ خلايا حية. إذا كان أقل من ٨٠٪ حياً بهذا الاختبار تكون الخلايا غير مناسبة للمزرعة. الخلايا البذرية بمعدل ١ x ١٠^٦ إلى ٢ x ١٠^٦ خلية/مل للمزرعة الثابتة ومعدل ٤ x ١٠^٦ خلية/مل للزجاجات المدوارة. هذه التركيزات الخلوية تعطي طبقة واحدة في ٢٤ ساعة، والعدد الأقل للخلايا يمكن أن يستخدم عند عدم الحاجة إلى اندماج طبقة الخلايا خلال ٢٤ ساعة.

مزارع خلية كلية أجنة الدجاج أو مزارع خلية كلية الدجاج

Chick Embryo Kidney (CEK) Cell Culture or Chicken Kidneys (CK) Cell Culture

يمكن أن تجهز هذه المزارع من كلى أجنة الدجاج الخالية من الممرضات النوعية عمرها ١٩ — ٢٠ يوماً أو صيصان دجاج خالية من الممرضات النوعية عند عمر ١ — ٣ أسابيع. الطريقة العامة تكون كالآتي:

١) في حالة كلى الأجنة، احصل على الأجنة من البيض بشكل معقم. استخلص الكلى واجمعها في طبق بتري يحتوي محلول ملح فسيولوجي. في حالة كلى الدجاج اعدم الصيصان بسحق فقرات الرقبة أو بغاز ثاني أكسيد الكربون عن طريق الاستنشاق واغمرها في مطهر. اسلخ الجلد وافتح البطن وأزل الكلى بشكل معقم وضعها في زجاجة مع محلول محلول ملح فسيولوجي.

٢) اغسل كلى الدجاج ٢ — ٣ مرات بمحلول محلول ملح فسيولوجي بواسطة رج الزجاجة بعنف شديد. اترك قطع الكلى لترسو وتخلص من السائل الرائق. الغسيل ليس مهماً مع كلى أجنة الدجاج.

٣) اغسل مرة واحدة كما سبق مع ٥٠ مل من محلول تربسين فيرسين السابق تدفئته، واترك المعلق حتى يرسب لمدة دقيقتين قبل التخلص من المحلول الرائق.

٤) ضع التربسين كالتالي: أضف ٤٠ — ٥٠ مل من محلول تربسين-فيرسين دافئ حديث التحضير. رج بعنف وضع الزجاجة عند ٣٧° م لمدة ٥ دقائق، واسكب الرائق بحرص ومرره خلال طبقتين من الشاش إلى كأس أو قارورة تحتوي على ٥٪ (حجم/حجم) مصل عجل. احفظ هذه الخلايا عند ٤°م. كن حريصاً لتبقى قطع الكلية في الزجاجة لعملية التربسين الإضافية.

٥) كرر الخطوة ٤، كل مرة أضف الحصاد لنفس الوعاء حتى تجمع خلايا كافية أو حتى يستنفد نسيج الكلى.

٦) اسكب الخلايا إلى أنابيب طرد مركزي، واطرد مركزياً (١٠ دقائق عند ٣٥٠ إكس جي) وعلق الراسب في وسط النمو المناسب (الجدول رقم ٤٢,٢). عد الخلايا كما تم في مزرعة أجنة الدجاج الليفية، وعد تجمعات الخلية الصغيرة كخلية واحدة. ابذر ٠,٥ x $١٠^{٦}$ إلى ١ x $١٠^{٦}$ خلية/مل للمزارع الثابتة، وضاعف عدد الخلايا للمزارع المدوارة. سوف تتكون طبقة واحدة كاملة في ٤٨ ساعة. خلايا كلى الدجاج يمكن أن تعامل بالتربسين بشكل زائد بسهولة، وأفضل النتائج سوف يتم الحصول عليها عندما يوجد عدد من التجمعات الصغيرة من ٣ — ٥ خلايا في المعلق.

هـ أنواع ا لية الأخرى Preparation of Other Cell Types

مزارع ا لية الليمفاوية Lymphocyte Cultures

تتكاثر فيروسات عديدة في الخلايا الليمفاوية. يمكن أن تحضر المزارع قصيرة العمر من الخلايا الليمفاوية الطحالية كالتالي:

١) اجمع الطحال من الدجاج كما وصف من الكلية وضع الطحال في محلول ملح فسيولوجي.

٢) ادفع الطحال بخفة خلال مصفاة من النايلون فتحاتها ٦٠ نانومتراً (Tetco, Inc., Kansas City, Mo.; cat. no. 3-95-39) باستخدام محقن معقم ومحلول محلول ملح فسيولوجي. يمكن أن توضع شبكة النايلون فوق كأس زجاجي صغير وتغطى برقائق الألمونيوم وتعقم بالأوتوكلاف.

٣) اسكب معلق الخلية في أنابيب واطرد مركزياً لمدة ١٠ دقائق عند ٣٥٠ إكس جي، وأعد تعليق الخلايا في محلول ملح فسيولوجي وغطِّ المعلق بحرص على مسطح ٢ — ٤ مل (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.). اطرد مركزياً عند ٤٠٠ إكس جي لمدة ١٥ دقيقة واجمع الخلايا من السطح الفاصل.

٤) اغسل الخلايا في محلول ملح فسيولوجي وأعد تعليقها في وسط خلايا ليمفاوية (مثل LMH في الجدول رقم ٤٢,٢) عد الخلايا واضبط حتى ١ x $١٠^{٦}$ - ٥ x $١٠^{٦}$ خلية/مل. حضن الخلايا عند ٤١°م في حضان ثاني أكسيد الكربون.

تنخفض الحيوية سريعاً خلال ٢٤ — ٧٢ ساعة. وتعقب بإضافة وسط مناسب conditioned medium (CM) (انظر بأسفل) أو الإثارة بمحفزات الانقسام mitogens لمدة ٧٢ ساعة يعقبها إضافة CM أو وسط مناسب يمكن أن يطيل حيوية الخلايا الليمفاوية. الناقلات الكيميائية الخلوية cytokines المستنسخة مع استثناء الإنترفيرون ألفا وبيتا وجاما وإنترليوكين فهي غير متوفرة، لكن من المتوقع أن العديد من الإنترليوكينات سوف تصبح متاحة في المستقبل القريب. يتوقع أن استخدام هذه الإنترليوكينات سوف يسهل زراعة الخلايا الليمفاوية خاصة بعد الإثارة بمحفزات الانقسام.

الوسط المشروط الذي يحتوي على إنترلوكينات يمكن أن يجهز كالتالي: جهز خلايا ليمفاوية من الطحال كالسابق وأعد تعليقها بمعدل ٢ x $١٠^{٧}$ خلية/مل في LMH بدون مصل (قاعدة — LM) أو مع ٢٪ مصل دجاج (LM-2). استثر الخلايا بإضافة كونكانافالين A مقترن مع قطع أو خرز سيفاروز (Pharmacia Biotech). اغسل الخرز عدة مرات بمحلول الغسيل (٠,٥ عياري كلوريد صوديوم، ٢٠ مللي مول تريس، بي إتش ٧,٤) وعادل الخرز طوال الليل في ثلاثة أحجام من LM-base. اخلط أحجاماً متساوية من الخلايا الليمفاوية والخرز بنسبة $١٠^{٧}$ خلية/مل و٠,٣٪ (حجم/حجم) من الخرز. حضن الخليط لمدة ٤٨ ساعة واجمع السائل الرائق. هذه الطريقة هي أفضل من استخدام كونكانافالين A المقترن بخلايا الدم الحمراء (B. W. Calnek and K. A. Schat, unpubl. data). السائل الرائق يمكن أن يستخدم كمصدر للوسط المشروط أو يمكن أن ينقى أكثر عند الرغبة في ذلك. جمد عند —٧٠° م للحفظ طويل الأمد.

خلايا كبد جنـ الدجاج Chick Embryo Liver Cells

استخدم أجنة عمرها ١٤ — ١٦ يوماً. اجمع الكبد واطحنه رفيعاً. خلايا الكبد هشة، لذلك تجرى عملية التربسين بحرص. لا ترج أو تقلب بشدة.

خلايا الرئة، القلب، الغدد التناسلية ـنـ الدجاج

Chick Embryo Lung, Heart, and Gonadal Cells

استخدم أجنة ١٤ — ١٦ يوماً لخلايا الرئة و٢٠ يوماً للقلب والغدد التناسلية، وجهز الخلايا بنفس طريقة الخلايا الليفية لجنين الدجاج.

خلايا أوتار جنـ الدجاج Chick Embryo Tendon (CET) Cells

اجمع الأوتار القابضة من الأقدام من أجنة عمرها ١٧ — ١٨ يوماً. حضن الأوتار طول الليل في وسط Ham's F10 مزود بـ ٥٠ ميكروجرام/مل أسكوربات الصوديوم والمضادات الحيوية ويعقب ذلك الهضم بالتربسين ٠,٢٥٪ والكولاجين ٠,٢٪ لمدة ٢ — ٣ ساعات في وسط إيجل المعدل بواسطة دلبيكو المزود بـ ٥٠ ميكروجرام/مل

أسكوربات الصوديوم، ومضادات حيوية و٥٪ مصل أجنة الأبقار. تستخدم خلايا أوتار جنين الدجاج لدراسة فيروسات الريو في الطيور (5).

خلايا أمعاء الطيور Avian Intestinal Cells

مؤخراً، طورت مزارع خلية أمعاء الطيور وقد تعطي وسيلة مفيدة لعزل ممرضات الطيور المعدية ودراسة تكاثر الكوكسيديا. وصفت الطريقة باستعمال خلايا الأعورين من الرومي عقب الفقس وخلايا الأمعاء للرومي حديث الفقس (2 ,3). يستأصل الأعوران ويغسلان عدة مرات بمحلول إتش بي إس إس HBSS المحتوي على مضادات حيوية، وشقه طولياً وقطعه إلى أجزاء صغيرة. اغسل عدة مرات بشدة بمحلول إتش بي إس إس، وقطع القطع أكثر بمشرط، وعلق في محلول إتش بي إس إس يحتوي على ٣٠٠ ميكروليتر/مل من إنزيم كولاجين، و٠,١ جرام/مل دايبيز وحضن لمدة ٣٠ دقيقة مع التقليب. اسحب القطع بعنف واحصد الخلايا وعلقها بمعدل ١ x ١٠^{٦} - ٢ x ١٠^{٦} خلية/مل في وسط النمو المحتوي على M-199 مزودة بـ ٤,٥ مجم/مل جلوكوز، و٥٪ مصل أجنة العجول، و٥ ميكروجرام/مل هيبارين، و٢,٥ ميكروجرام/مل إنسولين، و١٠ نانوجرامات/مل عامل نمو الخلايا الجلدية، ومضادات حيوية قياسية، و٠,٢٪ جنتاميسين. يمكن أن تمرر هذه الخلايا عدة مرات. تم عمل خط خلايا للطيور (3).

يمكن أن تؤخذ خلايا أمعاء الرومي من الأمعاء المفتوحة طولياً لكل الجهاز المعوي (2). تحضن القطع في ٠,١٥٪ إن-أسيتيل سيستيين لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة مع تقليب خفيف لإزالة المخاط. يحصل على الخلايا بالرج الهادئ لقطع ٢ — ٣ سم في وسط أساسي أدنى Joklik's modified minimum essential medium (GIBCO-BRL) مزود بـــ ٢٥ مللي مول HEPES، و٢,٥ مجم/مل جلوكوز، و١٪ زلال مصل الأبقار، و٥٠ ميكروجرام/مل جنتاميسين، و١ مللي مول إديتا. تخلص من الخلايا المأخوذة في فترة أول خمسة دقائق. احصد الخلايا بعد ٢٥ دقيقة من التحضين واغسل عدة مرات لإزالة الإديتا. علق الخلايا من الطبقة الأعلى واغسل عدة مرات وعلق في وسط النمو الذي يتكون من إما CMRL-1066 أو الوسط الأساسي الأدنى المزود بـ ٢٥ مللي مول HEPES، و٥٪ مصل أجنة العجول، و٥٪ مصل دجاج، ومضادات حيوية، و٢ مجم جلوكوز/مل، و٣٨ ميكروجرام/مل حمض أسكوربيك، و١,٥ ميكروجرام/مل ترانسفيرين، و٤ مللي مول (جلوتامين-إل)، و١٠$^{-٨}$ سليلينايت الصوديوم، و٢٠ نانوجرام/مل عامل نمو الطبقة الجلدية، و٥ ميكروجرام/مل بينتاجاسترين، و١٠$^{-٨}$ حمض ديوكسي كوليك، و٠,٢ ميكرومول بروجيسترون، و٢٥ نانوجرام/مل تراي أيودو ثيرونين، و١٠ ميكروجرام/مل إنسولين، و٥ ميكرومول يوتريسكين (بي إتش = ٦,٩). تؤخذ النتائج المثلى بفرد الخلايا الجلدية على طبقات التغذية للخلايا الليفية النخاعية الأولية عندما تصل إلى ٤٠ — ٥٠٪ من الانفصال.

و وحفظ مزارع ا لايا Growth and Maintenance of Cell Cultures

يمكن أن تنمو الخلايا المنتشرة المحضرة بالطرق السابقة في أنواع مختلفة عديدة من الأوعية اعتماداً على الغرض الرئيسي. عادة تُنمى المزارع في قوارير زجاجية أو بلاستيكية أو أطباق بتري أو أطباق دقيقة متعددة تحتوي على ٤ — ٩٦ حفرة. يعتمد العدد المرغوب من الخلايا على عدة عوامل تشمل :

١) نوع ومستوى تمرير الخلية : في العموم تزرع المزارع الأولية مع عدد كبير من الخلايا لكل ملليتر أكثر من المزارع الثانوية. خطوط الخلية يمكن أن تعد غالباً حتى ٥ x $١٠^{٤}$ - ١ x $١٠^{٥}$ خلية/مل.

٢) استخدام مزارع الخلية : تتكاثر أنواع معينة من الفيروسات أفضل في الخلايا نشطة الانقسام، بينما تستطيع أنواع الفيروسات الأخرى أن تتكاثر في المرحلة الثابتة. قد يختلف المستوى الأمثل بين المعامل المختلفة ويتحدد غالباً بالمحاولة والفشل. الأوعية التي تفتح في الجو (مثل أطباق بتري أو الأطباق متعددة الحفر والقوارير أو الأنابيب ذات الأغطية غير المحكمة)، يجب أن تحضن عند ٣٧,٥ — ٣٩ْ م في هواء يحتوي على ٣٪ - ٥٪ ثاني أكسيد الكربون و٨٠٪ - ٨٥٪ رطوبة لتجنب فقد ثاني أكسيد الكربون، لجعل المزارع قلوية ولمنع تبخر الماء من الأوساط. المزارع في الأنابيب المغلقة لا تحتاج ك $أ_{٢}$ أو جو رطب. في حالة صحة عدد الخلايا وظروف المزارع، يجب أن تتكون الطبقة الواحدة في ١٨ - ٢٤ ساعة للخلايا الليفية النخاعية.

الطبقات الواحدة على أغطية زجاجية Monolayers on Coverslips

يمكن أن تنمو الخلايا على أغطية زجاجية موضوعة في أطباق بتري أو في أنابيب لايتون Leighton. يجب أن تجهز الأغطية الزجاجية كما وصف في الأوعية الزجاجية الأخرى. ضع الأغطية المعقمة في أطباق أو أنابيب، وأضف معلق الخلايا على سطح الغطاء. تأكد أن الأغطية تكون على قاع الطبق ويمكن إزالة فقاعات الهواء بهدوء بطرف الماصة. الطرق الأخرى تكون كما وصفت سابقاً. يمكن حصد الأغطية بطريقة معقمة بعد زمن مناسب. استخدم وسط آجار طري (٠,٥٪) في حالة الحاجة لتغطية الطبقة الواحدة بالآجار المحتوي على الوسط حتى لا يجذب الطبقة الواحدة من الغطاء أثناء الجمع.

حفظ مزارع ا لية Maintenance of Cell Cultures

يستبدل وسط النمو بوسط أقل نسبة في المصل (وسط الحفظ) عندما يتم تكوين المزارع الطبقية الكاملة. استبدل وسط الحفظ كل ٢ — ٣ أيام اعتماداً على التغير في درجة الأس الهيدروجيني. يستخدم غالباً وسط آجار التغطية لحفظ خلايا كلى الدجاج (الجدول رقم ٤٢,٣)، بالرغم من أن خلايا كلى الدجاج تستمر روتينياً لمدة ٦ — ٨ أيام في وسط F10-199 (الجدول رقم ٤٢,١) المزود بـ ٠,٢٪ مصل أجنة العجل. إذا استخدم وسط آجار التغطية، من المهم إضافة كمية صغيرة من وسط آجار التغطية كل ٢ — ٣ أيام لمنع جفاف الآجار.

خطوط الآجار وا زارع الثانوية Cell Lines and Secondary Cultures

خط الخلية هو عدد من الخلايا يشتق من نسيج حيواني وينمى خارج الجسم الحي لمدة ستة أشهر أو أكثر على الأقل لأكثر من ٥٠ تمريرة متتالية. خط الخلية المستنسخ هو خط خلية مشتق من خلية مفردة تحتوي فقط على نواة واحدة. خطوط الخلية وخطوط الخلية المستنسخة تستخدم بكثرة في مزارع خلية الثدييات لكن ليس في مزارع خلية الطيور مع استثناءات قليلة. خط خلية QT-35 صنع من خلايا سرطانية ليفية كونت نتيجة إضافة ميثيل كولانثرين في السمان الياباني. خط خلايا الدجاج الليفية النخاعية الخالي من الفيروس (CHCC-OU2) استخدم مؤخراً لزراعة فيروس مرض مارك (1). ظاهرياً، يمكن أن يظل فيروس مرض مارك كامناً في هذه الخلايا عند عدم ترك الخلايا لتصل لتكوين طبقة كاملة. العديد من خطوط الخلية الليفية النخاعية fibroblast الأخرى قد وصفت لكنها يحتمل أن تكون إيجابية للفيروسات الارتدادية retroviruses. طور العديد من خطوط الخلية الليمفاوية النخاعية من سرطانات نتيجة لفيروس مرض مارك وفيروس سرطانات الطيور وفيروس ريتيكلوإندوثيليوزيس.

مزارع خلايا أجنة الدجاج الليفية الأولية وبعض المزارع الأولية الأخرى يمكن أن تستمر بواسطة عمل عدد محدود من التمريرات بدون إدراك خط خلية. يمكن حصد كميات كبيرة من خلايا أجنة الدجاج الليفية عند ٤٨ ساعة (انظر لاحقاً) وتحفظ في النيتروجين السائل (انظر أسفل) للاستخدام المستقبلي. هذه التقنية لها مميزات متعددة عن التجهيز المتكرر للخلايا الأولية.البيض الخالي من الممرضات النوعية وتجهيز الخلايا الأولية يعتبر مكلفاً. يمكن معايرة مجاميع من الخلايا المجمدة للنمو الأمثل، الأمر الذي يسهل استخدام خلايا أجنة الدجاج الليفية عند وقت الملاحظة. عموماً، لا يمكن أن تُكرر زراعة خلايا أجنة الدجاج الليفية بشكل كافي لأكثر من أربعة تمريرات، إلا أن إضافة مصل دجاج ١٪ إلى وسط النمو والتحضين عند ٤١ °م يسهل التمريرات الإضافية.

رير مزارع ا لية Passage of Cell Cultures

استخدم الطريقة التالية لتجهيز المزارع الثانوية أو لتمرير خط الخلية:

١) تخلص من الوسط الرائق.

٢) اغسل الخلايا لوقت قصير بمحلول محلول ملح الفوسفات (الذي يجب أن يكون خالياً من الكالسيوم والماغنسيوم عند استخدام فيرسين كمحلول انتشار) لإزالة الأيونات ثنائية التكافؤ المتبقية (التي تعطل الفيرسين). أحياناً يتبع هذه الخطوة غسيل قصير بمحلول تربسين فيرسين.

٣) أضف مباشرة محلول تربسين فيرسين كافي لتغطية المزرعة وحضن عند درجة حرارة الغرفة أو ٣٧ °م حتى تستدير الخلايا وتأخذ في الانفصال عن السطح. مبدئياً يحدد الوقت المستهلك لاستدارة الخلايا بالفحص المجهري المتكرر، على الرغم أنه مع وجود الخبرة يكون الفحص المجهري ليس ضرورياً.

٤) رج أو اسحب الخلايا المنفصلة وضَع الخلايا ومحلول تربسين فيرسين في أنبوبة طرد مركزي مع ٥٪ من المصل. احفظ الأنبوبة على الثلج حتى وقت الطرد المركزي. اشطف الأوعية بمحلول ملح الفوسفات لجميع الخلايا المتبقية. الخطوة الاختيارية للغسيل بمحلول ملح الفوسفات مهمة عند الحاجة لجمع كل الخلايا.

٥) اطرد مركزياً عند ٣٥٠ إكس جي لمدة ١٥ دقيقة وتخلص من الرائق وأعد تعليق الخلايا في وسط النمو.

٦) عند الرغبة، عد الخلايا كما وصف في المزارع الأولية.

٧) خفف الخلايا عند الضرورة وأبزرها في أوعية زراعة جديدة. في الأعم، تعطي المزرعة الأولية مزرعتين ثانويتين بنفس الحجم، بينما خطوط الخلايا الجاهزة يمكن أن تقسم إلى خمسة زراعات أخرى أو أكثر.

عامة، لا تلتصق خطوط الخلايا الليمفاوية النخاعية بأوعية المزرعة ويمكن أن يعاد زرعها ببساطة بإجراء العد وإعادة ضبطها حتى ٠,٥ x ١٠^{٦} خلية/مل. أحياناً يكون الطرد المركزي (١٥ دقيقة عند ٤٠٠ إكس جي) على Ficoll-Paque مطلوباً لإزالة الخلايا الميتة.

ميد ا لايا Freezing of Cells

يمكن أن تجمد العديد من خطوط الخلية وكذلك الخلايا الأولية والثانوية للاستخدام اللاحق. الجهاز الوحيد المطلوب بالإضافة إلى الموجود في معظم المعامل هو مجمد بدرجات حرارة مناسبة. يمكن أن تجمد الخلايا إلى مالانهاية في النيتروجين السائل (-١٩٦°م) أو لمدة أسابيع حتى شهور عند –٧٠°م، على الرغم من تناقص الحيوية. الخلايا النامية النشطة بين ٢ – ٥ أيام بعد الفرد تعطي أفضل نتائج على الرغم أن الأخرى يمكن أن تستخدم شاملة الخلايا المفرودة مباشرة من الأعضاء وخلايا الدم. الطريقة تكون كالآتي:

١) جهز الخلايا كما وصف سابقاً في جزء تمرير مزرعة الخلية.

٢) اطرد الخلايا مركزياً عند ٣٥٠ إكس جي لعشر دقائق واستبعد الرائق.

٣) أعد تعليق الخلايا في وسط تجميد بارد عند تركيز حتى ٥ x ١٠^{٧} خلية/مل. يتكون وسط التجميد من وسط نمو (مثل M20 في الجدول رقم ٤٢,٢) مزود بـ ٧,٥٪ داي ميثيل سلفو أكسايد (ديمسو) و١٠ – ١٥٪ مصل.

٤) املأ عبوة الحفظ واغلقها بدون تأخير.

٥) ضع العبوة في إناء معزول في الحالة المتبخرة لوعاء النيتروجين السائل لمدة ٤٥ دقيقة حد أدنى أو في مجمد عند –٧٠°م لمدة ٣ – ٢٤ ساعة. التجميد الأمثل يتطلب انخفاضاً تدريجياً للحرارة بمعدل حوالي ١ درجة/دقيقة. تتوافر المجمدات المبرمجة لهذا الغرض ولكنها مكلفة وباهظة ولتجميد كميات صغيرة من الخلايا.

٦) انقل العبوة إلى المرحلة السائلة لوعاء النيتروجين السائل.

يمكن أن تصنع الأوعية المعزولة من صندوق كرتون أو بلاستيك أو خشب أو معدن أو أوعية الماصات. يجب أن تحتوي على عازل كامن لتسمح بالانخفاض التدريجي في الحرارة (مثل العبوة مع الماء عند درجة الغرفة توضع في وعاء، سيأخذ الماء على الأقل ٣٠ دقيقة ليتجمد عند وضعه في –٧٠° م).

مباشرة قبل الاستخدام ترفع الخلايا من النيتروجين السائل وتوضع في الماء عند درجة حرارة الغرفة. ينصح بإضافة ١٠٪ (حجم/حجم) من مطهر مثل ٥,٢٥٪ هيبوكلوريت الصوديوم (مثل كلوروكس) إلى الماء، لأن الفيروسات يمكن أن تتواجد في النيتروجين السائل نتيجة لتحطم الأمبولات. من المهم استعمال كمامة وجه وقفازات سميكة عند إزالة العبوة من النيتروجين السائل للحماية من قطع الزجاجة عند تحطم الأمبول. يجب أن يُرج الأمبول بثبات حتى ذوبان آخر قطعة ثلجية وتؤخذ المحتويات فوراً بشكل معقم وتخفف ببطء في وسط النمو. الأمثل، يمكن أن يخفف ١ مل من معلق الخلية من الأمبول في ١٠ مل من الوسط، وبعد ذلك يخفف أكثر إلى التركيز النهائي اعتماداً على عدد الخلايا الحية أو المعايرة السابقة لمجموعة الخلايا المجمدة.

تطبيقات تقنيات مزرعة ا لية علم الف وسات

Application of Cell-Culture Techniques in Virology

إن أكثر العوامل أهمية التي تؤخذ في الاعتبار في دراسات تشمل الفيروسات هي طريقة مزرعة الخلية المعرضة للإصابة بالفيروس ووسط النمو المناسب الخالي من الأجسام المضادة ومثبطات الخلية أو الفيروسات غير النوعية والظروف البيئية الأفضل لحفظ الخلايا أثناء الوقت الكامل للتجربة. يمكن أن يكتشف تكاثر الفيروس بالطرق الآتية:

١) يسمى التغير المورفولوجي للخلايا التأثير الخلوي الممرض ويتسبب بواسطة التغيرات المدمرة أو كما مع بعض فيروسات الأورام التحول تحت ظروف المزرعة الملائمة التي بها آجار التغطية وجرعة منخفضة من الفيروس المستخدم. يمكن مشاهدة التأثير المرضي الخلوي كبقع والتحول مثل بؤر. يمكن رؤية البقع بإضافة ١ مل من الأحمر المتعادل (١٪) إلى ١٠٠ مل من وسط آجار التغطية. بديلاً عن ذلك، قد يضاف الأحمر المتعادل مع آجار التغذية في وقت لاحق. احفظ المزرعة في الظلام بعد إضافة المتعادل الأحمر. الخلايا الحية تصبغ بينما الميتة تظهر كبقع صافية أو عديمة اللون.

٢) تكوين خلايا عملاقة ومدمج خلوي syncytia.

٣) ظهور أجسام احتوائية خلوية أو نووية تشاهد بصبغة بولي كروم.

٤) إحداث تغيرات في درجة الأس الهيدروجيني نتيجة للتغيرات في أيض الخلية.

٥) تغير صفات الادمصاص لخلايا الدم لغلاف الخلية.

٦) قدرة بعض الفيروسات غير الممرضة للتداخل مع أو تحفيز التأثير المرضي الخلوي للفيروسات الأخرى.

٧) الطرق المصلية التي تكتشف الأنتيجينات الفيروسية في أو على الخلية مثل التألق المناعي أو إليزا أو تثبيت المتمم.

٨) اختبار نواتج مزرعة الخلية في نظام عائل آخر.

٩) اكتشاف الأحماض النووية DNA أو RNA الفيروسية بالتهجين ساوزرن أو نورثن أو بتفاعل البلمرة المتسلسل أو تفاعل البلمرة المتسلسل الناسخ العكسي.

عزل الف وس Virus Isolation

تعتمد الطرق كثيراً على الفيروس المشكوك في وجوده ونوع العينة المستخدمة، إلا أن الطرق التالية تكون مناسبة:

١) اجمع الأعضاء أو الأنسجة مثل الرئيتين والكبد والمخ بطريقة معقمة، وقطعها إلى أجزاء صغيرة وتطحن ميكانيكياً. حضر ١٠٪ (وزن/حجم) معلق باستخدام ملح الفوسفات أو بي إس إس مع مضادات حيوية 5x في حالة التلوث الشديد. يجب أن توضع المسحات في أنابيب تحتوي على بي إس إس BSS أو وسط نمو مع مضادات حيوية. للشحن أو النقل يجب أن تعبأ العينات لمنع التسرب حسب تعليمات الشاحن أو التعليمات الحالية وتنقل مجمدة. عند الاشتباه في فيروسات مرتبطة بالخلية يحصل على دم مع هيبارين أو معلق خلية مفردة. يجب أن يجهز معلق الخلية من أعضاء بدون تكسير الخلايا باستخدام شبكة من النايلون أو في جهاز طحن Tenbroeck (Fisher Scientific, Pittsburgh, Penn.) على ثلج أو بتمرير القطع المطحونة خلال محقن. عند الضرورة جمد معلق الخلايا كما سبق وصفه.

٢) استخدم معلقاً خالياً من الخلية مباشرة كطعم أو جمد وأذب عدة مرات أو عالج بالاهتزاز بالموجات فوق الصوتية لتحرير أكبر كمية من الفيروس. ينقى المعلق بالطرد المركزي لمدة ١٥ دقيقة عند ١٠٠٠ إكس جي. لا يجب أن يجمد الدم أو معلق الخلايا ويذاب أو يطرد مركزياً.

٣) للطعم الخالي من الخلية، تخلص من وسط النمو من المزارع وأضف جزءاً من السائل الرائق من الخطوة السابقة. يجب أن يوجد سائل كافي لتغطية طبقة الخلايا الواحدة. ينصح بحقن المواد غير المخففة وأيضاً تخفيفات ١ : ١٠ و ١ : ١٠٠ من الناتج لأن المواد السامة في العينات غير المخففة غالباً تسبب تدميراً غير نوعي للخلايا. غيِّر وسط المزرعة إلى وسط حفظ عند استخدام طعم خلوي. أضف الخلايا مباشرة إلى مزارع الخلية. سوف ترسب خلايا الطعم المحتوي على الفيروس على الطبقة الواحدة.

٤) حضن المزرعة لمدة ساعة عند ٣٨ – ٣٩°م.

٥) اغسل الطبقة الواحدة بفيض من بي إس إس BSS لإزالة التلوث الزائد والمواد السامة من العينة (اختياري). في حالة ثبوت أهمية هذه الخطوة اغسل الطبقة الواحدة بحرص حتى لا تفصل الخلايا ضعيفة الالتصاق بالسطح. لا تغسل الطبقة الواحدة عند استخدام الطعم الخلوي.

٦) أضف وسط حفظ حديث وحضن عند ٣٨ – ٣٩°م.

٧) افحص الطبقة الواحدة المصابة وقَيِّمْها لمدة ٧ أيام على الأقل. في حالة عدم رؤية التدمير الخلوي أو عدم وضوحه اجمع الخلايا والسوائل من الأوعية وأجرِ تمريراً أعمى إلى خلايا طبقة واحدة جديدة. أحياناً يجب أن يجرى ٢ – ٣ تمريرات عمياء للحصول على دليل للتأثير المرضي الخلوي. لا تكون بعض الفيروسات تأثيراً مرضياً خلوياً في المزرعة ويجب أن تفحص لتغيرات أخرى. لمخزون الفيروس، يجب أن يُحصد السائل الرائق والخلايا عند بلوغ أقصى تأثير مرضي خلوي لكن قبل موت كل الخلايا. يمكن أن يجمد المعلق ويذاب أو يعالج بالاهتزاز بالموجات فوق الصوتية وينقى بالطرد المركزي منخفض السرعة ويحفظ مجمداً. تجمد الفيروسات المرتبطة بالخلية كما سبق شرحه وتحفظ في النيتروجين السائل. ينصح بجمع الفيروسات المرتبطة بالخلية قبل أقصى تأثير خلوي مرضي، عندما تكون الخلايا أفضل حيوية.

References المراجع

1. Abajoub, A., and P. M. Coussens. Development of a sustainable chick cell line infected with Marek's disease virus. Virology 214:541-549. 1995.
2. Alt, A., and D. L. Reynolds. Primary cell culture of turkey intestinal epthelial cells. Avian Dis. 40:103-108. 1996.
3. Augustine, P. C. Establishment of a turkey cecal cell line and development of turkey coccidia within the cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 206:152-156. 1994.
4. Freshney, R. A. Culture of animal cells. A manual of basic technique, 2nd ed. Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y. 396 pp. 1987.
5. Huang, D. D. Restriction of avian reovirus in primary chicken embryo tendon cells. Virology 207:117-126. 1995.
6. Moscovici, C., M. G. Moscovici, H. Jiminez, M. M. C. Lai, M. J. Hayman, and P. K. Vogt. Continuous tissue culture cell lines dervived from chemically induced tumours of Japanese quail. Cell 11:95-103. 1977.
7. Versteeg, J. Color atlas of virology. Year Book Medical Publications Ltd., London, U.K. 233 pp. 1985.



الفصل الثالث والأربعون

تكاثر الفيروس في أجنة البيض
VIRUS PROPAGATION IN EMBRYONATING EGGS

دينيس أ. سين
Dennis A. Senne

الملخص Summary

أجنة البيض هي أحد أهم أنظمة العائل الفائقة وواسعة الاستخدام لعزل وتنمية العديد من فيروسات الطيور. يمكن أن تؤثر العديد من المتغيرات على نجاح أو فشل أجنة البيض لدعم نمو الفيروس، وبعض المتغيرات التي سيتم تغطيتها في هذا الفصل تشمل مصدر البيض المخصب وأنواعه وعمر الجنين وطريقة الحقن وظروف التحضين. يعطي هذا الفصل أيضاً مقالة مفصلة على تحضير العينة وحقن البيض عن طريق الكيس السقائي وكيس المح والغشاء الكوريوني والكيس الأميني وجمع العينات من الأجنة المحقونة وطرق تمرير البيض.

المقدمة Introduction

تمثل أجنة بيض الدجاج منذ زمن أهم أنظمة العائل واسعة الاستخدام لعزل وتنمية وتوصيف فيروسات الطيور ولإنتاج اللقاحات الفيروسية. يعطي الجنين وأغشيته المدعمة تعدداً لأنواع الخلية الضرورية لزراعة عديد من أنواع الفيروسات المختلفة، إلا أن نجاح أو فشل هذا النظام لنمو وعزل الفيروسات يعتمد على ظروف عديدة (1) وهي: طريقة الحقن، وعمر الجنين، وحرارة التحضين، وطول فترة التحضين عقب الحقن، وحجم وتخفيف الطعم المستخدم، والحالة المناعية للقطيع مصدر البيض. لتقنين الظروف لعزل ونمو الفيروس في أجنة البيض، يجب أن يؤخذ كل من هذه المقاييس في الاعتبار للفيروس محل السؤال.

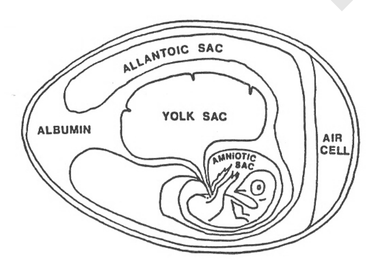
كما في أي نظام يستعمل لعزل الفيروس، كشف إصابة الفيروس قد يكون محتملاً. يمكن أن يكتشف نمو الفيروسات في أجنة بيض الدجاج في أغلب الحالات بواحدة أو أكثر من الطرق التالية (3): موت الجنين، وآفات في الغشاء الكوريوالانتويس مثل الأديما أو تكوين البقع، وآفات جنينية مثل التقزم، والأنزفة الجلدية، والنمو غير

الطبيعي للعضلات والريش، والتغيرات في الأعضاء الحشوية التي تشمل تضخم الكبد والقلب، وتغير لون الكبد إلى الأخضر، وتكوين ترسيبات بولية في نسيج الكلى.

تشمل الطريقة المباشرة والمحددة لكشف الإصابة بالفيروس في أجنة الدجاج: قدرة السوائل السقائية الأمينية (AAF) في إحداث تلازن الدم (HA) للخلايا الحمراء المغسولة من الدجاج، واستعمال تقنيات مصلية وجزيئية مثل الإليزا ومسابير الحامض النووي دي إن إيه المكمل والمجهر الإلكتروني (1 ,3). يجب أن يؤخذ حرص خاص لتفريق الآفات التي قد تسبب بوجود العوامل البكتيرية.

تركيب البيض المخصب الجنيني Structure of the Embryonating Egg

يقع مباشرة تحت قشرة البيضة غشاء القشرة. يبطن هذا الغشاء السطح الداخلي الكلي للبيضة ويُكَوِّن خلية الهواء عند الناحية المنثلمة للبيضة (الشكل رقم ٤٣,١) وهو يساعد في الحفاظ على العدد الميكروبي للبيضة، بينما يسمح بدخول الغازات في وخارج البيضة. يسهل توزيع الغازات خلال البيضة بتكوين الغشاء الكوريوالانتويس كثير الأوعية الدموية والذي يعمل كعضو تنفسي للجنين. إن تكوين هذا الغشاء يحدث بالقرب من غشاء القشرة في كل أنحاء البيضة. أثناء التطور يكون هذا الغشاء تجويفاً كبيراً نسبياً يعرف بالكيس السقائي الذي يحوي بين ٥ و١٠ مل من السائل القانقي (الشكل رقم ٤٣,١)، ويحاط الجنين مباشرة بالغشاء الأميني مكوناً الكيس الأميني الذي يحتوي ١ – ٢ مل من السائل الأميني. يتصل الجنين بكيس المح الذي يقع قريباً في مركز البيضة ويمد التغذية الضرورية لتطور الجنين (2).



الشكل رقم (٤٣,١). تكوين البيض الجنيني.

مصدر البيض وطرق التحضين التمهيدية
Source of Eggs and Preliminary Incubation Procedures

يجب أن يحصل على البيض المخصب أقل من أسبوع من قطيع أمهات نشط متعافٍ خالٍ من الممرضات النوعية والذي يختبر بانتظام لمعظم الممرضات الفيروسية والبكتيرية الشائعة في الطيور. تعطي معظم المصادر نشرات

الاختبارات حسب الطلب. صلاحية أي عزل قد تقيم بواسطة وجود العوامل المنتقلة عن طريق البيض مثل فيروسات أدينو الطيور، وفيروس التهاب الدماغ الطيري، وفيروس مرض النيوكاسل، وفيروس سرطان الطيور، وفيروس الالتهاب الشعبي المعدي، وفيروس الجمبورو، وفيروس ريو الطيور، وفيروس أنيميا الدجاج، والميكوبلازما، والسالمونيلا (1). قد يستعمل بيض الأجنة من الأنواع الأخرى (مثل الرومي والسمان والبط) أيضاً (1)، إلا أن بعض الضوابط في العمر الذي يحقن عنده الجنين قد تكون ضرورية نظراً للفروق في التطور الجيني. يحتاج بيض البط على سبيل المثال ٢٨ يوماً من التحضين ليفقس مقارنة مع بيض الدجاج (٢١ يوماً).

قد توجد أيضاً أجسام مضادة في صفار البيض المنتج من دجاجات نوعية المناعة. قد يستخدم البيض من دجاجات إيجابية الأجسام المناعية لعزل الفيروس أو تنميته إذا كانت الطرق المستخدمة غير طريق كيس المح وتكتمل طريقة العزل قبل وصول الأجنة لليوم الخامس عشر من التحضين وهو الوقت عندما يبدأ الجنين في امتصاص الأجسام المضادة من المح. يجب أن يستخدم البيض إيجابي الأجسام المضادة فقط عند عدم توفر مصدر بديل جيد.

عند العمل مع بعض الفيروسات مثل سرطان الطيور، قد يلعب التكوين الجنيني لقطيع الأمهات دوراً مهماً في تحديد ملائمة بعض البيض المستخدم في عزل الفيروس أو تكاثره، وبعض سلالات الدجاج تكون مقاومة طبيعياً لعترات محددة لفيروس الليكوزيس أو سرطان الطيور.

مبدئياً يجب أن يحضن البيض في حضان مناسب عند درجة ٣٨ – ٣٩°م ورطوبة نسبية ٦٠٪ – ٧٠٪ إذا أمكن. يجب أن يقلب البيض عدة مرات يومياً ليسمح بنمو أمثل ويمنع التصاق الأغشية الجنينية (2). عادة يحضن البيض ٦ – ١١ يوماً قبل إمكانية حقنه، ويتحدد طول التحضين بطريقة الحقن المستخدمة. يجب أن يفحص البيض بعد ٥ – ٦ أيام من التحضين لتحديد المخصب وغير المخصب أو الميت. يجب أن يستبعد البيض الذي به أجنة ضعيفة أو خلية هوائية غير طبيعية في الحجم أو الموقع. يجرى الفحص في غرفة مظلمة باستخدام إضاءة مجهر أو آلة فحص مناسبة. تسمح إضاءة المجهر المحمولة للبيض أن يفحص بينما يوضع على مسطح البيضة، ومن ثم تلغى الحاجة لتداول كل بيضة.

تحضير العينة Sample Preparation

يختلف نوع العينة المرسلة لعزل الفيروس تبعاً للمرض المشتبه لكن يتكون عادة من الأنسجة أو المسحات. يجب أن تجهز معلقات العينات في شوربة تربتوز–تريس (١,٢١ جم تريس لكل لتر من شوربة التربتوز) أو شوربة التغذية أو شوربة بي إتش آي أو وسط مناسب آخر يحتوي على مضادات حيوية. قد يعتمد تركيز المضاد الحيوي المستخدم على نوع العينة لكن يجب أن يحتوي كحد أعلى على بنسللين (١٠٠٠٠ وحدة/مل)، وسلفات

ستربتوميسين (٢ مجم/مل)، وسلفات جنتاميسين (١ مجم/مل)، وسلفات كاناميسين (٠,٦٥ مجم/مل)، وأمفوتربسين B (٠,٠٢ مجم/مل). من المهم أن تكون درجة الأس الهيدروجيني لمخفف المضادات الحيوية مضبوطة حتى معدل ٧ – ٧,٤. للأفضل يحضر محلول مركز من المضادات الحيوية وتضبط درجة الأس الهيدروجيني للمخفف المستخدم ويجهز مقدماً ويحفظ عند –٢٠ °م. يمكن أن تجهز الأنسجة كمعلق ١٠٪ – ١٥٪ بالطحن بالطرق السالف ذكرها، وفي كابينة زرع ذات أمان حيوي. يجب أن تخفف المسحات في حجم صغير عادة (٣ – ٤ مل)، ثم توضع على هزاز لاستخلاص أكبر قدر من العينة بقدر الإمكان من ألياف المسحة. يطرد معلق العينات والمسحات مركزياً عند ١٠٠٠ – ١٥٠٠ إكس جي لمدة ٢٠ دقيقة في جهاز طرد تحت تبريد (٤ – ١٠ °م) لترسيب بقايا الأنسجة ومعظم البكتيريا ثم ينقل الرائق بشكل معقم ويوضع في عبوات كافية لحقن الأجنة والحفظ. يجب أن تحفظ العينات عند درجة حرارة الغرفة مع المضادات الحيوية لمدة ١ – ٢ ساعة قبل حقنها في البيض لتخفيض المشاكل البكتيرية. يمكن أن ترشح العينات شديدة التلوث بالبكتيريا التي لا تزول بالطرد المركزي أو المضادات الحيوية خلال مرشح غشائي معقم ٤٥٠ نانوميكروناً، وهذا يعتبر كحل أخير بسبب احتجاز تجمعات الفيروس على سطح المرشح، ومما يقلل من العزل الناجح. يجب حفظ العينات عقب الحقن عند –٧٠ °م للاستخدام المستقبلي.

طرق الحقن Routes of Inoculation

الطرق الرئيسية الأربع للحقن في أجنة البيض عن طريق الكيس السقائي وكيس المح والغشاء الكوريوالانتويس والكيس الأميني. يفضل الغشاء الكوريوالانتويس بسبب حساسيته لعدد كبير من الفيروسات ولأنه أقل تأثراً بالتلوث البكتيري (3). يشيع استخدام كيس المح والكيس السقائي ولهما نفس الحساسية لعزل عوامل عديدة. يجب أن يستخدم الحد الأدنى ٤ أجنة لكل عينة ولكل طريقة حقن.

تفحص كل الأجنة قبل الحقن لحيويتها ولتحديد موضع الحقن وتطهر بمحلول ٧٠٪ كحول إيثيلي يحتوي على ٣,٥٪ يود و١,٥٪ يوديد الصوديوم على مكان القطع المعد للحقن. يصنع ثقب في القشرة باستخدام مثقاب له طرف مدبب بعد تطهيره بالمطهر السابق قبل كل استخدام لتجنب تلوث مكان الحقن. عقب الحقن، يقفل الثقب بالصمغ أو البارافين الذائب ويعاد البيض إلى الحضان. في حالة إبقاء البيض المحقون محضناً حتى الفقس فإنه يجب أن يقلب عدة مرات يومياً ليضمن التطور الطبيعي للجنين، إلا أنه لا يكون مطلوباً لمعظم طرق العزل الفيروسي الروتينية. تشبه الطرق المذكورة لاحقاً تلك الطرق الموصوفة سابقاً (3, 2, 1).

حقن الكيس السقائي Allanotic Sac Inoculations

الطريقة أ Method A

هي الأكثر استخداماً وهي كالتالي :

١) افحص بيض الأجنة عمر ٨ – ١١ يوماً وحدد مكان خلية الهواء.

٢) ضع البيض على مسطح وغرفة الهواء لأعلى وطهر مكان الحقن في الخطوة ١. اصنع ثقباً صغيراً خلال القشرة مباشرة فوق غرفة الهواء وكن حذراً حتى لا تجرح غشاء القشرة كما في الشكل رقم (٤٣,٣).

٣) احقن ٠,١ – ٠,٣ مل من الطعم لكل بيضة بغرس إبرة بطولها الكامل رأسياً خلال الثقب من المنتصف واحقن الكمية المرغوبة.

٤) أغلق الثقب وأعد البيض إلى الحضان. يحضن البيض المحقون بهذه الطريقة ٣ – ٧ أيام عقب الحقن.

الطريقة ب Method B

١) افحص بيض أجنة عمر ٨ – ١١ يوماً، وتأكد أن كل الخلايا الهوائية في وضعها الطبيعي.

٢) ضع البيض على مسطح وكرر الخطوة ٢ في الطريقة أ.

٣) كرر الخطوة ٣ كما في الطريقة أ بما يخص الحقن كما في الشكل رقم (٤٣,٢) وتجنب تحريك الإبرة إلى الأجناب عند غرسها لمنع تهتك غشاء الكوريون الذي قد يسبب نزفاً ونفوق الجنين.

٤) أغلق الثقب وأعد البيض إلى الحضانة كما في خطوة ٤ من الطريقة أ.

حقن كيس المح Yolk Sac Inoculation

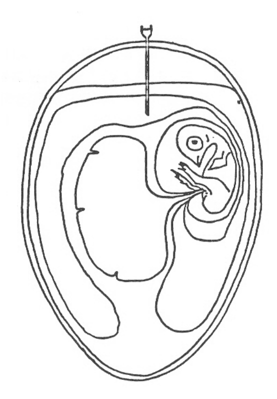
١) افحص بيض الأجنة عمر ٦ – ٨ أيام وحدد مركز خلية الهواء.

٢) ضع البيض مسطحاً وغرفة الهواء لأعلى وطهر سطح قمة البيضة حول خلية الهواء.

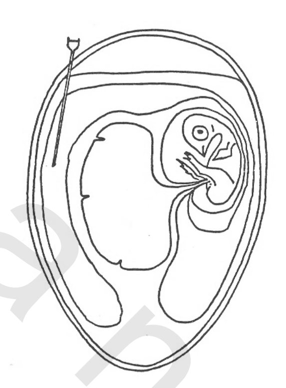
٣) اثقب ثقباً صغيراً خلال القشرة على المحور المركزي عند قمة البيضة (الشكل رقم ٤٣,٤).

٤) احقن ٠,١ – ٠,٥ مل من الطعم لكل بيضة بغرس الإبرة عمودياً بطولها الكامل. للتأكد أن موضع الحقن في كيس المح، اسحب المحقن بهدوء، ويسحب الصفار عندما تكون الإبرة داخل كيس المح.

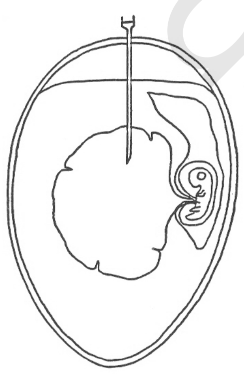
٥) أغلق الثقب وأعد البيض إلى الحضانة، ويحضن البيض الذي تم حقنه بهذه الطريقة عامة من ٣ – ١٠ أيام أو في بعض الأحيان حتى الفقس.



الشكل رقم (٤٣,٢). طريقة حقن الكيس السقائي طريقة A.



الشكل رقم (٤٣,٣). طريقة حقن الكيس السقائي طريقة B.

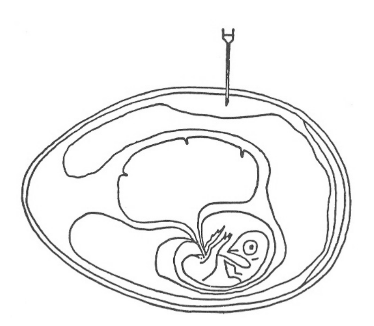


الشكل رقم (٤٣,٤). طريقة حقن كيس المح.

حقن الغشاء الكوريوالانتويس Chorioallantoic Membrane Inoculation (CAM)

١) افحص بيض الأجنة عمر ١٠ – ١١ يوماً وحدد جانب البيضة تقريباً في منتصف الطريق على طول المحور الطولي حيث يكون تركيب الوريد واضحاً.

٢) ضع البيض في الوضع الأفقي على مسطح وعقم كلاً من خلية الهواء وجانب البيضة المحدد في الخطوة السابقة (الشكل رقم ٤٣,٥).



الشكل رقم (٤٣,٥). طريقة حقن الغشاء الكوريوني السقائي.

٣) اثقب ثقباً صغيراً خلال القشرة وغشاء القشرة عند مركز خلية الهواء.واثقب ثقباً آخر على جانب البيضة وكن حريصاً حتى لا تخترق غشاء القشرة.

٤) عند هذه النقطة يجب أن تؤخذ البيضة إلى غرفة مظلمة لعمل وملاحظة انكماش الغشاء الكوريوني. جهز محقن اختبار السل يحتوي على محلول ملح فوسفات واستخدم ماصة مطاطية متصلة بمصدر شفط أو شفاط مطاطي. بينما تحمل البيضة على جهاز الفحص اشفط بهدوء عند الثقب في خلية الهواء. اغرس سن الإبرة عند الثقب على جانب البيضة مباشرة تحت القشرة عند زاوية سطحية ثاقباً غشاء القشرة وليس الغشاء الكوريوني ليسقط ، ومن ثم تتكون خلية هواء وهمية جديدة مباشرة فوق الغشاء الكوريوني. أحياناً يكون حقن قطرة صغيرة جداً من محلول الملح المعقم على الثقب المصنوع جانب القشرة مساعداً في تسهيل عملية التنقيط ويعمل كمزلق لفصل الغشاء الكوريوني من غشاء القشرة. بمجرد أن يقطر الغشاء الكوريوني أغلق الثقب عند خلية الهواء واترك البيضة أفقياً.

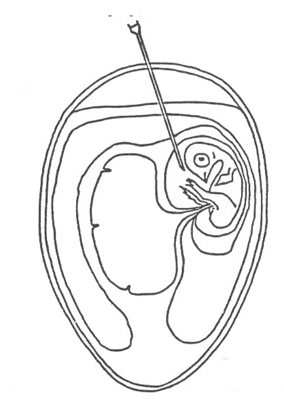
٥) باستعمال محقن وإبرة مقاس ٢٥ ، ٠,٦٢٥ بوصة (١٦ ملم) احقن ٠,١ — ٠,٣ مل من الطعم لكل بيضة عمودياً مباشرة داخل القشرة واحقن الكمية المرغوبة.

٦) اقفل الثقب واطرق البيضة بهدوء لتوزع الطعم بالتساوي فوق سطح الغشاء الكوريوني وأعد البيضة إلى الحضانة. يجب أن تحضن البيضة أفقياً لمنع غرفة الهواء الوهمية من الانحراف لأن ذلك يسبب نفوقاً غير نوعي. يحضن البيض المحقون بهذه الطريقة لمدة ٥ — ٧ أيام.

حقن الكيس الأميني Amniotic Sac Inoculation

١) افحص بيض الأجنة عمر ١٠ — ١١ يوماً وحدد الموضع العام للجنين عند قاعدة خلية الهواء.

٢) ضع البيضة وخلية الهواء لأعلى وطهر المساحة على قمة البيضة مباشرة واصنع ثقباً صغيراً خلال القشرة على المحور الطولي عند قمة البيضة (الشكل رقم ٤٣,٦).



الشكل رقم (٤٣,٦). طيقة حقن الكيس الأميني.

٣) خذ البيضة إلى غرفة مظلمة لأن هذه الطريقة تتطلب إضاءة البيضة أثناء الحقن. استخدم محقناً له إبرة مقاس ٢٢ ، ١,٥ بوصة (٣٨ ملم) ووجه الإبرة ناحية ظل الجنين. عند اقتراب طرف الإبرة للكيس الأميني اطعن باتجاه الجنين للسماح للإبرة أن تخترق الغشاء الأميني وعندئذ احقن ٠,١ — ٠,٢ مل من الطعم. لرؤية أن الإبرة في الكيس الأميني حرك الإبرة بحرص على الأجناب، وإذا كانت الإبرة في الكيس يجب أن يكون هناك رد فعل للجنين لحظة حركة طرف الإبرة.

٤) أغلق الثقب وأعد البيضة إلى الحضانة. في هذه الطريقة عامة يحضن البيض من ٢ — ٤ أيام عند درجة حرارة مناسبة للفيروس المراد تنميته.

جمع العينات من بيض الأجنة

Collection of Specimens from Embryonating Eggs

يجب أن يفحص البيض المحقون على الأقل مرة يومياً للتعرف على البيض نافق الأجنة ويجب أن يزال من الحضانة لأن استمراره قد يسبب انخفاضاً في تركيز الفيروس نتيجة للتثبيط الحراري ومن الممكن أن يسبب تغيرات في الأنسجة الجنينية مما يؤدي إلى صعوبة تقييم الآفات في الجنين أو أغشيته المدعمة (1). يجب أن تستبعد الأجنة النافقة في الـ ٢٤ ساعة الأولى كنفوقات غير نوعية بسبب جرح أو تلوث بكتيري. يجب أن تعتبر كل الأجنة النافقة بعد ٢٤ ساعة مشتبهة. في حالة بقاء الأجنة حية بعد الزمن المحدد، يجب أن تبرد بحد أدنى ٥ ساعات (يفضل طول الليل) لقتل الأجنة والسماح للدم أن يتجلط قبل جمع مكونات البيضة. يمكن أن يسبب وجود خلايا حمراء في السائل السقائي والأميني انخفاضاً في معيار بعض الفيروسات مثل باراميكسو وأرثوميكسو الملزنة لخلايا الدم الحمراء. عند العمل مع الأنسجة والسوائل الجنينية المعدية فإنه يوصى باستخدام كابينة ميكروبيولوجية آمنة من المستوى الثاني Class II.

تشمل الأدوات والمواد اللازمة للجمع اثنين من الكؤوس سعة ٢٥٠ مل مملوءة بمطهر (واحد للقشرة وآخر للملاقط المستعملة)، وملقطاً رباعي الأطراف منحنياً معقماً، وماصات ٥ مل معقمة أو محاقن ٥ — ١٠ مل لها إبر مقاس ١٨ أو ٢٠ أو ١,٥ بوصة (٣٨ ملم) لجمع سوائل البيض، وأنابيب بغطاء معقمة سعة ١٢ x ٧٥ ملم بلاستيكية أو عبوات مناسبة أخرى، ووعاء للماصات في حالة استخدامها.

يجب أن يعقم البيض المحتوي على العينات على السطح بالمطهر المذكور سابقاً أو أي نوع آخر مناسب. يمكن أن يستعمل الكحول بسهولة وسرعة بواسطة رشاش ضباب أو رزاز ويترك ليجف من المطهر قبل جمع العينات.

جمع السوائل السقائية Collection of AAF

من البيض الذي به الأجنة النافقة From Eggs with Dead Embryos

١) اكسر القشرة فوق خلية الهواء بواسطة ملقاط معقم. أزل جزءاً من القشرة المكونة لخلية الهواء وتخلص منها في مطهر. تخلص من الملقاط في كأس به مطهر.

٢) استخدم ملاقط مختلفة لتقطيع غشاء القشرة والغشاء الكوريوني والأميني لإطلاق السوائل السقائية. اضغط على الأغشية فوق كيس المح بملاقط لتسمح بتجمع السوائل فوق الملاقط. اسحب السوائل بماصة أو محقن في العبوات كما سبق وصفها. لاحظ أنه يمكن سحب السوائل الأمينية والسقائية منفصلة باستخدام محقن من كل تجويف قبل ثقب الأغشية.

٣) ازرع السوائل لخلوها من البكتيريا باستخدام آجار الدم أو الآجار المغذي وحضن عند ٣٧°م طول الليل وسجل النتائج.

٤) نقِّ السوائل بالطرد المركزي عند ١٥٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق واختبرها لنشاط تلازن الدم باستعمال طريقة المعايرة الدقيقة لفيروسي مرض نيوكاسيل وإنفلونزا الطيور.

٥) احفظ السوائل عند –٧٠°م للتمرير أو استخدام آخر.

جمع السوائل الجنينية من البيض الذي به أجنة حية From Eggs with Live Embryos

يمكن أن تؤخذ عينات من السوائل من البيض ٢٤ — ٧٢ ساعة عقب الحقن بدون اختبار للبيض. وهذا يكون مهماً في ظروف حيث يكون التشخيص مطلوباً بشكل طارئ. إذا تم بحرص يمكن إعادة البيض للحضانة لاستمرار التحضين. استخدم الطريقة التالية:

١) اصنع ثقباً خلال القشرة فوق خلية الهواء، واستعمل محقناً له إبرة مقاس ٢٢، ١,٥ بوصة (٣٨ ملم)، وأدخل الإبرة في اتجاه القشرة بزاوية ٤٥ — ٦٠ درجة من المحور الرأسي.

٢) اسحب ٠,١ — ٠,٥ مل من السوائل السقائية لتقييم دلائل الإصابة بالفيروس باستعمال اختبار تلازن الدم أو المجهر الإلكتروني أو الطرق الأخرى المناسبة.

٣) أقفل الثقب وأعد البيض للتحضين.

جمع الغشاء الكوريوني السقائي Harvesting the CAM

طريقة أ Method A

هي الأكثر استخداماً وهي كتالي :

١) اكسر القشرة فوق الغرفة الهوائية الوهمية كما سبق وصفه وأزل قشرة البيضة على أطراف الغرفة الهوائية وتخلص من القشرة والملاقط في مطهر.

٢) لاحظ الغشاء الكوريوني للأعراض مثل السمك (الأوديما) وتكوين البقع.

٣) اجمع الأغشية بإمساكها بملاقط واسحب السوائل المتبقية بملقاط آخر. ضع الأغشية في طبق بتري معقم للفحص الإضافي أو في أنابيب بغطاء أو أوعية أخرى مناسبة للحفظ.

٤) توضع الأنابيب للحفظ في التجميد عند –٧٠ ْم.

طريقة ب Method B

١) افتح البيض لجمع AAF كما وصف سابقاً.

٢) باستخدام الملاقط المعقمة ، أزل الجنين والمح بعناية.

٣) اسكب السوائل المتبقية.

٤) لاحظ الغشاء لوجود تغيرات كما سبق وللفحص الأقرب يؤخذ الغشاء في طبق بتري معقم للفحص.

٥) يحفظ الغشاء في أنابيب ذات غطاء محكم ١٢ x ٧٥ ملم أو أمبولات وتجمد عند –٧٠ ْم

جمع غشاء كيس المح Harvesting the Yolk Sac Membrane

١) افتح البيضة كما وصف سابقاً.

٢) مزق الغشاء الكوريوني لتسمح بمدخل إلى غشاء كيس المح.

٣) أمسك غشاء كيس المح بعناية بواسطة ملقاط وارفعه لتفصله من الجنين والأغشية الأخرى. استعمل ملقطاً آخر وتخلص من الصفار وضعه في أنابيب معقمة بغطاء ١٢ x ٧٥ ملم أو أي وعاء آخر.

٤) احفظ كيس المح عند –٧٠ ْم.

جمع الجنين/أنسجة الطائر أو الأعضاء Harvesting Embryo/Bird Tissues or Organs

قد تكون الأنسجة و/أو الأعضاء من الأجنة المحقونة مصدراً مفيداً للمواد المصابة بالفيروس ويجب أن لا تهمل. بالإضافة إلى ذلك يكون الانتظار حتى تفقس الأجنة المحقونة وعند ذلك تجمع العينات من الطائر حديث الفقس يكون مفيداً أحياناً. يجب أن تجمع الأنسجة والأعضاء من الأجنة والطيور بشكل معقم باستخدام طرق التشريح القياسية وتقيم للاستدلال على إصابة الفيروس بالطرق المناسبة.

تمرير مواد البيض Passage of Egg Material

في معظم الحالات حيث لا يكتشف الفيروس عند التمرير الأول، يتطلب تمريراً إضافياً أعمى. عند استخدام السوائل السقائية كطعم للتمرير يجب طردها مركزياً لمدة ١٠ — ٢٠ دقيقة عند ١٥٠٠ إكس جي وتخفف ١ : ١٠ أو أكثر في مخفف يحتوي على مضادات حيوية قبل الحقن. يجب أن يجهز الغشاء الكوريوني السقائي وكيس المح وأعضاء وأنسجة الجنين كمعلق ١٠٪ في مخفف مضادات حيوية وتطرد مركزياً عند ١٥٠٠ إكس جي لمدة ٢٠ دقيقة قبل الحقن.

المراجع References

1. Cottral, G. E., ed. Manual of standardized methods for veterinary microbiology. Comell University Press, Ithaca, N.Y. pp. 47-52. 1978.
2. Hawkes, R. A. General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. In: Diagnostic procedures for viral, rikettsial and chlamydial infections, 5th ed. E. H. Lennette, and N. J. Schmidt, eds. American Public Health Association, Washington, D.C. pp. 1-48. 1979.
3. Hitchner, S. B. Virus propagation in embryonating eggs. In: Isolation and identification of avian pathogens. S. B. Hitchner, C. H. Domermuth, H. G. Purchase, J. E. Williams, eds. Creative Printing Company, Endwell, N.Y. pp. 120-121. 1980.


obeikandl.com

الفصل الرابع والأربعون

تعريف وتصنيف الفيروسات
VIRUS IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION

بيدرو فيليجاس وفيل د. لوكرت
Pedro Villegas and Phil D. Lukert

الملخص Summary

يتطور تصنيف فيروسات الحيوانات بثبات نظراً للاستعمال المستمر للتقنيات الجديدة التي تزيد معرفة الفيروسات غير المصنفة سابقاً كما حدث مع فيروس أنيميا الدجاج الذي صنف حالياً على أنه فيروس سيركو (Circovirus). طورت طرق جديدة لدراسة نوع الحمض النووي الموجود في الفيروس موفرة كمية وافرة من الوقت والحصول على نتائج أكثر دقة. يمكن التعرف على العديد من فيروسات الطيور بسهولة بمميزاتها مثل نشاط تلازن الدم كما في حالة فيروس مرض نيوكاسيل والإنفلونزا ومتلازمة انخفاض البيض. يعطي تأثير بعض الفيروسات الذي يحدث في العوائل التي تزرع فيها أحياناً مؤشرات جيدة جداً لنوع الفيروس الموجود. تعتبر مقدرة فيروسات هيربس لإحداث بقع في الطبقة الواحدة لخلايا الطيور الأولية، وتأثير الممرض النمطي الذي يحدثه فيروس أدينو في الطبقة الواحدة لخلايا كبد أجنة الدجاج، والآفات التي يحدثها فيروس الالتهاب الشعبي المعدي في أجنة الدجاج هي أمثلة للتعرف الفيروسي. يمكن تحديد حجم وشكل وتماثل ووجود أو غياب الغلاف بواسطة المجهر الإلكتروني. يمكن بالتقنيات الحديثة دراسة وتصنيف الفيروس إذا كان قادراً على النمو في مزارع الخلية أو الأجنة.

المقدمة Introduction

تعتمد المواصفات الموجودة لتصنيف فيروسات الحيوان على الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروس. تقسم الفيروسات إلى مجموعتين أساسيتين وهما: فيروسات تحتوي على حامض نووي ديوكسي ريبوزي وأخرى تحتوي على حامض نووي ريبوزي. تقسم فيروسات دي إن إيه إلى ثماني عائلات، ستة منها تضم ممرضات للطيور. عرفت ١٦ عائلة من فيروسات آر إن إيه، ١١ منها تحتوي على فيروسات ممرضة للطيور. قد تحتوي العوائل الأخرى على

فيروسات ممثلة في أنواع الطيور لكنها لم تعرف حتى الآن مع المرض الإكلينيكي. الجدول رقم (٤٤،١) ينص على عوائل فيروسات دي إن إيه و آر إن إيه ، وأغلب أمراض الطيور المهمة المرتبطة بكل عائلة.

ا دول رقم (٤٤,١). عوائل ف وسات دي إن إيه و آر إن إيه وأهم ف وسات الطيور[٨].

النوع	العائلة	ا نس	ف وسات الطيور
		ف وسات دي إن إيه	
ds - دي إن إيه	الجدري	جدري الطيور	جدري الطيور، جدري الكناري، جدري الحمام
	أدينوفيريدي	أدينوفيريدي الطيور	التهاب الكبد، متلازمة نقص إنتاج البيض، التهاب معوي نزفي في الرومي والتدرج والإوز
	بابوفيريدي	فيروس بوليوما	مرض أفراخ الباغاوات، سقوط الريش في الببغاء، التهاب الحنجرة والقصبة الهوائية المعدي
	هيربس فيريدي	فيروس ألفا هيربس	التهاب أمعاء البط الفيروسي (طاعون البط)
		فيروس جاما هيربس	مرض مارك وفيروس هيربس في الرومي وفيروسات هيربس الطيور الطليقة والمنزلية
ss - دي ان ايه	بارفوفيريدي	فيروس بارفو	فيروس بارفو الإوز والدجاج (مرض ديرزي)
		فيروس ديبندو	فيروسات مصاحبة للأدينو
	سيركوفيريدي	فيروس سيركو	فيروس أنيميا الدجاج وفيروس المنقار والريش
		ف وسات آر إن إيه	
ds - آر إن إيه	ريوفيريدي	فيروس أورثوريو	التهاب المفصل الفيروسي وريو فيروس الحمام (١-٩)
		فيروس روتا	فيروس روتا المسبب للنزيف المعوي
	بيرنافيريدي	فيروس أفيبرنا	مرض البورسا المعدي
ss - آر إن إيه (-)	أورثومايكسوفيريدي	فيروس انفلونزا أ، ب	أنلونزا أ
	بارامايوكسوفيريدي	فيروسروبيولا-فيروس بارامايوكسو	فيروس مرض النيوكاسل وفيروس بارامايوكسو الحمام (٢-٩) والتهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري

تابع ا دول رقم (٤٤,١).

ss - آر إن إيه (+)	التاجية	فيروس تاجي	التهاب الشعب في الحمام والفيروس التاجي المسبب للنزيف المعوي في الرومي
	كاليسيفيريدي	فيروس كاليسي	فيروس كاليسي الطيور
	أستروفيريدي	فيروس أسترو	فيروس التهاب الكبد من النوع الثاني في البط
	بيكورنافيريدي	غير محدد	التهاب المخ الطيرى (الارتعاش الوبائي) وفيروس التهاب الكبد من النوع الأول والثالث وفيروس التهاب الكبد في الرومي
	توجافيريدي	فيروس توجا	فيروس أربو المعدي في الدجاج والتهاب المخ في الطيور البرية
	فلافيفيريدي	فيروس فلافي	التهاب المخ في الرومي
	ريتروفيريدي	فيروس ريترو	فيروس ساركوما وتكثر نسيج البيض ليكوسيس وشباك بطاني ريتيكيلواندوثيليوسيس والفيروسات السرطانية

[^] ds = خيط ثنائي، ss = خيط أحادي، (-) = سلبي، (+) = إيجابي.

تستخدم صفات عديدة لتصنيف وتعريف الفيروسات. ملخص هذه الصفات كالتالي :

١) صفات الفيروس : الحجم، والشكل، ووجود أو غياب الغلاف، وتماثل البيلومر والكابسيد Peplomers and capsid.

٢) صفات المجين : نوع الحمض النووي (دي إن إيه أو آر إن إيه)، وشكل الشريط (مفرد أو مزدوج)، وخطي أو دائري، والحاسة (إيجابي أو سلبي أو كلاهما)، وعدد القطع، وحجم المجين، وتتابع القواعد النوائية ... إلخ.

٣) خصائص البروتينات : العدد، والحجم، والأنشطة الوظيفية للبروتينات التركيبية وغير التركيبية، وتتابع الحمض النووي.

٤) التكاثر : إستراتيجية تكاثر الحمض النووي، والمرض الخلوي، وتكوين الأجسام الاحتوائية.

٥) الخواص الفيزيائية : الثبات عند درجة الأس الهيدروجيني، والحرارة، والمذيبات، والمنظفات، والكاتيونات.

٦) الخواص البيولوجية : مدى العوائل الطبيعية، وطريقة انتقال العدوى، وعلاقة العامل الناقل، والإمراضية، والقابلية لنسيج محدد، والمرض المجهري، والتوزيع الجغرافي، والعلاقات المصلية.

من هذه الخصائص، تستخدم أربعة صفات رئيسية في تصنيف الفيروس وهي: نوع الحمض النووي، والحساسية لمذيبات الدهون التي تعني وجود غلاف دهني بروتيني، وقطر الفيروس، وتماثل الكابسيد النووي (مكعب أو لولبي). تسمح معرفة هذه الخصائص الفيزيوكيميائية بوضع الفيروس في عائلة داخل مخطط التصنيف الموضوع لفيروسات الحيوان. يمكن أن يتم التعرف على الفيروس حالياً مع استخدام المجهر الإلكتروني النافذ، وتجهيزات الصبغة السلبية يمكن أن يشاهد الفيروس والحجم والشكل والسطح والتماثل. تقلل هذه التقنية من استخدام أنظمة مجهدة لتحديد شكل وتماثل الفيروسات. يمكن أن تستخدم التقنية في مزرعة الخلية أو الأنسجة المصابة أو التحضيرات الفيروسية غير المنقاة (6).

أيضاً مع استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة والببتيدات المخلقة وخريطة الموقع البروتيني، توجد قواعد جزيئية جديدة الفهم لهذه العلاقات المصلية التي تستخدم أساساً لتصميم العائلات والأجناس. حالياً نفذ تتابع المجين أو التتابع الجزئي مبكراً في تعريف الفيروس وحتى الأنشطة التشخيصية (8).

يمكن استخدام بعض الصفات الخاصة لفيروسات الطيور المختلفة للتعرف السريع (6 ,8)، شاملة الآتي:

١) القدرة لتلزن كرات الدم الحمراء للدجاج تستخدم للتعرف على فيروس مرض نيوكاسيل وفيروس الإنفلونزا ومتلازمة انخفاض البيض لأن هذه الفيروسات تلزن تلقائياً الخلايا الحمراء للدجاج.

٢) تنمو معظم فيروسات أدينو الطيور جيداً في خلايا الطبقة الواحدة من كبد الدجاج محدثة إمراضية خلوية نمطية مع وجود احتوائيات داخل الأنوية.

٣) تكوين البقع على الغشاء الكوريوالانتويس لأجنة البيض مع احتوائيات نمطية سيتوبلازمية يميز فيروسات جدري الطيور.

٤) تكوين مدمج خلوي في وحيدة الطبقة لخلايا الطيور الطلائية الابتدائية يمكن أن يحدث بواسطة فيروس الريو خاصة بعد معالجة التجهيزات بمذيبات الدهون، وأيضاً تحدث فيروسات ريو أنزفة واحتقاناً في أجنة الدجاج. تكوين المدمج الخلوي يمكن أن ينتج بالعديد من فيروسات الطيور ولا يجب أن يستعمل كوسيلة وحيدة لتعريف الفيروس.

٥) يلاحظ طبيعياً تقزم الأجنة مع فيروس الالتهاب الشعبي المعدي (فيروس كورونا) وفيروسات أدينو، إلا أن العترات المتأقلمة في الأجنة لفيروس الالتهاب الشعبي المعدي تحدث تقزماً أكثر شدة وخللاً في تكوين الريش والتصاقاً قوياً للجنين لغشاء الكوريوالانتويس.

٦) فيروس مارك وفيروسات هيربس الطيور الأخرى يمكن أن تدرك في الخلايا الطلائية الأولية وحيدة الطبقة بتكوينها للبقع أو البؤر النمطية. بمجرد التأقلم، يمكن أن تلاحظ هذه الإمراضية الخلوية في الخلايا الليفية النخاعية وحيدة الطبقة لجنين الدجاج.

تجرى التقنيات لتحديد الصفات الفيروسية بسهولة بمجرد عزل الفيروس وتطور طريقة القياس لمعايرته أو في حالة وجود كمية كافية من الفيروس يمكن تنقيتها من أنسجة العائل المصاب بالفيروس. إن تحديد نوع الحمض النووي يعتبر أحد الخطوات الرئيسية في تعريف الفيروس.

ديد نوع ا مض النووي Determining Type of Nucleic Acid

الطرق ا باشرة Direct Methods

تتطلب هذه الطرق تركيزاً وتنقية لفيروس يتبعها استخلاص وتوصيف الحمض النووي بإنزيم نيوكلييز أو التحلل المائي الكيميائي التفريقي. بداية، ينتج كمية كبيرة من الفيروس وتمزق الخلايا أو الأنسجة بالطحن و/أو التجميد والإذابة. تزال بقايا الخلايا بالطرد المركزي عند ١٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ — ١٢ دقيقة، وعندئذ يغطى الرائق بطبقة من سكروز ٤٥٪ ويرسب بالطرد المركزي عند ١٤٠٠٠٠ إكس جي لمدة ساعتين عند ٤ °م. يعاد تعليق الفيروس المرسب في محلول تريس منظم عند بي إتش ٧,٤ وينقى بجعل الفيروس في حلقة في كلوريد السيزيوم أو السكروز المتدرج.

قد يركب كلوريد السيزيوم المتدرج بإعادة تعليق الفيروس في محلول تريس، وتضبط الكثافة إلى ١,٤ جم/مل مع كلوريد السيزيوم ويطرد مركزياً للاتزان (٢٧٠٠٠٠ إكس جي لمدة ١٦ ساعة عند ٢٠ °م). يجمع الفيروس بثقب جانبي بواسطة محقن له إبرة مقاس ٢٢.

يتم تكوين السكروز المتدرج الخطي (٢٠٪ - ٦٠٪ وزن/حجم) في محلول تريس ويعاد تعليق الراسب وتغطى من أعلى. بعد الطرد المركزي عند ٢٧٠٠٠٠ إكس جي لمدة ٩٠ دقيقة عند ٤ °م تجمع ربطة الفيروس بالثقب الجانبي.

بعد التنقية يضبط معلق الفيروس إلى تركيز ١٪ من سلفات دوديسيل الصوديوم (SDS) لتمزيق الفيروس. يستخلص عندئذ الحمض النووي مع فينول : كلوروفورم : كحول إيزوإميلي (٢٤ : ٢٤ : ١ حجم/حجم/حجم) بحجم مساوي لحجم العينة المائية. يرسب عند ذلك الحمض النووي في الحالة المائية مع ٣ جزيئات من خلات الصوديوم والكحول الإيثيلي (حمض نووي : خلات صوديوم : كحول إيثلي بنسبة ١ : ٠,١ : ٢ حجم/حجم/حجم) عند —٧٠ °م. يرسب الحمض النووي ويعاد إذابته في ماء مقطر. ويخضع عندئذ لإنزيمات نيوكلييز المختلفة لتحديد نوعه. يجرى تحليل فصل كهربائي على الآجاروز المصبوغ بالأكريدين البرتقالي أو بروميد الإيثيديوم للعينة المعالجة بالنيوكلييز أو غير المعالجة. في حالة حساسية الحمض النووي لإنزيم نيوكلييز معين، تشاهد الحارة المُعالجة كحلقة عند النقطة حيث يلاحظ الحمض النووي غير المعالج. وصفت الطريقة السابقة بالتفصيل في أماكن عديدة (11, 2).

الحمض النووي لكل من الفيروسات مفردة أو مزدوجة الشريط يُهضم كاملاً بوحدة واحدة من إنزيم دي إن إيبيز البنكرياسي لكل ٠,٥ من الميكروجرامات من دي إن إيه عند ٣٧ °م لمدة ٣٠ دقيقة. تهضم وحدة واحدة من نيوكلييز S1 ٠,٥ ميكروجرام من الحمض النووي مفرد الشريط في ٣٠ دقيقة عند ٣٧ °م، لكنها لا تؤثر على دي إن إيه مزدوج الشريط. يهضم الحمض النووي آر إن إيه لفيروسات آر إن إيه مفردة أو مزدوجة الشريط بإنزيم آر إن إيبيز البنكرياسي في تركيزات منخفضة من كلوريد الصوديوم (١ ملليمول)، لكن يُهضم فقط آر إن إيه مفرد الشريط في تركيز عالي من كلوريد الصوديوم (١٥٠ مللي مول). الطريقة الأخرى لتفريق آر إن إيه من دي إن إيه بإخضاع الحمض النووي إلى ٠,٣ مول من هيدروكسيد الصوديوم الذي يحطم آر إن إيه وليس دي إن إيه. عند استخدام الأكريدين البرتقالي لصبغ الحمض النووي في الفصل الكهربائي في الآجاروز سوف يشع الجزيء مفرد الشريط أحمر ومزدوج الشريط يشع اللون الأخضر.

تحدد الطبيعة المقسمة للمجين الفيروسي بالفصل الكهربائي في الآجاروز للحمض النووي المجيني في أيٍّ من هلام الآجاروز أو عديد الأكريلاميد مع ملاحظة أكثر من حلقة من الحمض النووي عندما يصبغ الهلام (2).

تشمل الطرق التقليدية لاستخلاص الأحماض النووية من العينات الإكلينيكية الهضم بإنزيم بروتينيز K ويليه الاستخلاص بالفينول والكلوروفورم : الكحول الأيزوإميلي (٢٤ : ١ حجم/حجم). ترسب الأحماض النووية الناتجة في وجود أملاح وإيثانول بارد. يغسل راسب دي إن إيه بالإيثانول البارد ٧٠٪ لإزالة أي ملوثات، ويجفف ويذاب في نظام محلول مناسب لطرق التقييم (12).

نُقلت الطريقتان التاليتان لتحضير دي إن إيه من الأنسجة ومزارع الخلية من نشرة الطرق الجزيئية لاكتشاف الفيروس (12).

طريقة ١ Method 1

١أ) اجمع خلايا مزرعة الخلية الملتصقة بعملية التربسين أو الكحت ويتبعها الطرد المركزي. الخلايا النامية في معلق قد تطرد مركزياً مباشرة. اغسل الخلايا المترسبة مرتين في محلول ملح فوسفات لإزالة الوسط الغذائي وبروتينات المصل.

١ب) البديل، اطحن الأنسجة جيداً بقدر المستطاع. قد تجمد هذه العينات في نيتروجين سائل وتطحن. تعطي الخطوة السابقة دي إن إيه أكثر لكن تُنتج هذه الطريقة مواداً كافية لعديد من الهضم القصري حتى من العينات الصغيرة المأخوذة من طائر حي (biopsy).

٢) أعد تعليق العينات في كلوريد تريس ١٠ ملليمول، بي إتش = ٨، ٢٥ ملليمول إديتا و١٠٠ ملليمول كلوريد صوديوم. أضف سلفات دوديسيل الصوديوم وبروتينيز K (لتحليل الخلايا ولتعطيل البروتين) إلى التركيزات النهائية ١٪ و ٠,١ مجم/مل على التوالي وحضن العينات ٢١ — ١٨ ساعة عند ٣٧ °م.

٣) استخلص العينات المهضومة مرتين بواسطة فينول : كلوروفورم : كحول إيزوإميلي، ورسب مع ٢ مجم كحول إيثيلي ١٠٠٪. استعد الحلقات البيضاء من الحمض النووي دي إن إيه (والحمض النووي آر إن إيه الملوث) بالطرد المركزي. اغسل الراسب بكحول إيثيلي ٧٠٪ وجفف.

٤) أعد تعليق الراسب في كلوريد تريس ١٠ ملليمول، رقم حموضة ٨، ١ ملليمول إديتا و١ ميكروجرام/مل إنزيم ريبونيوكلييز خالي من دي إنييز.

٥) أعد الاستخلاص العضوي المذكور في خطوة ٣، يعقبه الترسيب بالكحول الإيثيلي في وجود ٠,٥ مجم من خلات الأمونيوم ٧,٥ مول.

طريقة ٢ Method 2

وصفت هذه الطريقة بواسطة Grimberg *et al.* (7) وصممت للاستخلاص السريع للحمض النووي دي إن إيه من الدم الكامل لكن تعمل جيداً مع الخلايا المزروعة والأنسجة. يعتبر دي إن إيه عالي الوزن الجزيئي ومناسباً للهضم الإنزيمي القصري وكذلك تفاعل البلمرة المتسلسل يمكن أن يتم مع معاملات قليلة في ٢ – ٣ ساعات جاعلاً هذه الطريقة تقنية جذابة لمعامل التشخيص الجزيئي.

١) أطلق الأنوية بإضافة تريتون x ١٠٠ محتوياً على محلول (٠,٣٢ مول سكروز، ١٠ ملليمول هيدروكلوريد تريس، رقم حموضة ٧,٦، ٥ ملليمول كلوريد ماغنيسيوم، ١٪ تريتون x ١٠٠) إلى الدم الكامل أو الخلايا المترسبة. اجمع بواسطة الطرد المركزي عند ٩٠٠ إكس جي لمدة ٥ دقائق.

٢) علق الأنوية في ١٠ ملليمول هيدروكلوريد تريس، رقم حموضة ٨، ١٠ ملليمول كلوريد الصوديوم، ١٠ ملليمول إديتا، ١ مجم/مل بروتينيز K وحضن لمدة ساعتين عند ٦٥° م.

٣) استخدم الحمض دي إن إيه الناتج مباشرة أو عرضه إلى المعالجة بإنزيم آر إن إييز والاستخلاص العضوي كما وصف في طريقة ١.

من نفس البحث المنشور (12) نقلت طريقة تحضير آر إن إيه. كما تم في عزل دي إن إيه، تحتاج تحضيرات آر إن إيه الكامل إلى فصل سريع للحمض آر إن إيه من إنزيمات النواة الداخلية (endogenous nucleases). آر إن إييز RNase هو بروتين عالي الثبات قادر على مقاومة التعقيم بالأتوكلاف، ومن ثم يجب أن تؤخذ احتياطات عديدة لتجنب التلوث بإنزيم آر إن إييز. يجب أن ترتدي دائماً قفازات عند تحضير آر إن إيه لأن الجلد يمثل مصدراً لإنزيم آر إن إييز. يجب أن تعامل المحاليل المائية بمحلول ثنائي إيثيل بيروكربونات التي تعطل آر إن إييز. على الرغم من أن طرق التخلص من ريبونيوكلييز من الأوعية الزجاجية والبلاستيكية بسيطة نسبياً، إلا أن الماصات وأنابيب الاختبار التي تستخدم لمرة واحدة تكون خالية من ريبونيوكلييز ولا تحتاج إلى معالجة مسبقة.

تستعمل طرق عديدة شائعة لتحضير آر إن إيه من الأنسجة والخلايا المزروعة. اعتماداً على أملاح جوانيديوم ومعطلات البروتين القوية لإيقاف نشاط ريبونيوكلييز ولتحلل الخلايا. الطريقة الأكثر تكراراً المذكورة بواسطة Chirgwin *et al.* (3) وتعديلاتها تنتج عطاءً عالياً من آر إن إيه قليل الجودة من مصادر غنية بالريبونيوكلييز، إلا أن هذه الطريقة تتطلب معاملات عديدة، وكذلك طرد مركزي فائق السرعة طوال ليلة كاملة جاعلاً إياها أقل استخداماً لمعامل التشخيص الجزيئي. بدلاً من ذلك تفضل الطريقة البسيطة والأكثر سرعة Puissant and Houdebine (9) وفيها يعزل الحمض النووي آر إن إيه الكامل (عالي الكمية منخفض الجودة) خالي من الجزيئات الكبيرة الأخرى باستخدام ثيوسيانات جوانيديوم وفينول وكلوروفورم عند درجة بي إتش حامضية.

١) جهز مقدماً محلول مركز من ثيوسيانات جوانيديوم ٤ مول ، ٢٥ مللي مول سترات صوديوم بي إتش = ٧ و ٠,٥ ٪ ساركوسيل. هذا المحلول ثابت لأكثر من ٣ شهور عند درجة الغرفة. قبل الاستخدام اضف ٢- ميركابتوإيثانول لتركيز نهائي ٠,١ مول.

٢) اطحن الأنسجة الحديثة أو المجمدة عند ٤ °م في ١٠ مل من المحلول السابق (denatured solution). يمكن أن يحضر آر إن إيه من المزارع وحيدة الطبقة بإضافة المحلول مباشرة إلى الطبق.

٣) انقل ٥ مل من المواد إلى أنبوبة بولي بروبيلين التي تستخدم مرة واحدة. أضف التالي مع التقليب بعد كل إضافة: ٠,٥ مل خلات صوديوم، ٢ ملليمول، بي إتش = ٤، ٥ مل ماء مشبع بالفينول، ١ مل كلوروفورم.

٤) اطرد مركزياً عند ١٠٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق. تخلص من الحالة المائية ورسب آر إن إيه بكمية مساوية من أيزوبروبانول ١٠٠٪ عند −٢٠ °م. عند درجة بي إتش حامضية يبقى دي إن إيه والبروتينات في الحالة العضوية وعند السطح الفاصل.

٥) احصل على آر إن إيه بالطرد المركزي عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق.

٦) قلب بشدة الحبة عقب إضافة ٢ مل كلوريد ليثيوم ٤ مول لإذابة السكريات العديدة الملوثة. آر إن إيه غير الذائب يستخلص ثانية بالطرد المركزي عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق.

٧) أذب حبة آر إن إيه في ٢ مل تريس ١٠ ملليمول، بي إتش = ٧، ١ ملليمول إديتا، ٠,٥٪ سلفات دوديسيل الصوديوم واستخلص بواسطة ٢ مل كلوروفورم.

٨) اطرد مركزياً عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق. اجمع الطبقة العليا (المائية) ورسبها مع كمية مساوية من ١٠٠٪ أيزوبروبانول في وجود ٠,٢ مول خلات الصوديوم، رقم حموضة ٥.

يمكن أن تتم هذه العملية كاملة في أقل من أربع ساعات.

الطرق غ ا باشرة Indirect Methods

يمكن أن يتحدد أيضاً نوع الحمض النووي بطريقة غير مباشرة باستخدام مثبطات الأيض النوعية المختلفة التي تتداخل مع تكاثر الفيروس. هذه الطرق تفيد خاصة مع الفيروسات التي لا تتكاثر إلى مستويات عالية كافية لتركيزها وتنقيتها والتوصيف المباشر للأحماض النووية.

استخدام مثيلات الثيميدين thymidine analogs هي أبسط طريقة لتحديد ما إذا كان الفيروس يحتوي على حمض نووي دي إن إيه (10 ,11). مثبطات دي إن إيه الأكثر استخداماً هي 5-bromo-2´-deoxyuridine (BDU) و 5-iodo-2´-deoxyuridine (IDU) (Calbiochem Corp., San Diego, Calif.). يفضل نظام مزرعة الخلية لتنمية الفيروس بهذه الطريقة. توجد طريقتين أساسيتين: الأولى، يمكن معايرة الفيروس في مزارع خلية تحتوي على وسط مع ٥٠ ميكروجرام/مل من إما IDU أو BDU. قارن المستوى من هذه المعايرة مع معيار متوازي في وسط خالي من مثيلات الثيدميدين. يكون الفيروس محتوياً على دي إن إيه إذا كان المستوى ١ لوغاريتم ١٠ أقل مع مثيل ثيميدين. في الطريقة الثانية يمكن تنمية الفيروس في مجموعة من مزارع الخلية مع وسط يحتوي على أحد مثيلات الثيميدين بمعدل ٥٠ ميكروجرام/مل، ومجموعة أخرى بدون. بعد ٢٤ – ٤٨ ساعة يجمع الفيروس ويقاس مستواه ويقيم كما ذكر سابقاً. يجب أن يشمل مجموعات ضابطة بفيروس معروف مسبقاً احتوائه آر إن إيه وفيروس يحتوي على دي إن إيه. عندما يعامل كفيروس مجهول ويجب أن لا يثبط المجموعة الضابطة آر إن إيه بواسطة مثيلات ثيميدين، بينما يجب فيروسات مجموعة دي إن إيه يجب أن تتأثر.

حساسية الفيروس لأكتينوميسين D ذات قيمة في تفريق بعض فيروسات آر إن إيه. يمنع أكتينوميسين D نسخ الحمض النووي آر إن إيه المرسول من الحمض النووي مزدوج الشريط ومن ثم سوف يتداخل مع تخليق البروتين من فيروسات دي إن إيه مزدوجة الشريط وفيروسات آر إن إيه أو مع تخليق بروتين العائل. يحتاج فيروس الإنفلونزا نسخ بعض الحمض النووي آر إن إيه المرسول من العائل كحدث مبكر في دورة التكاثر ويثبط بواسطة أكتينوميسين D. تعتبر أعضاء عائلة فيروس ريو آر إن إيه أيضاً حساسة للأكتينوميسين D لأنها مزدوجة الشريط. يمكن أن تجرى حساسية الفيروس للأكتينوميسين D كالتالي (9):

١) حضر وسط مزرعة خلية يحتوي على أكتينوميسين D بمعدل ١ ميكروجرام/مل. تحذير: تأكد أن هذا المستوى من المضاد الحيوى غير سام للخلايا المستخدمة.

٢) عالج الخلايا بالأكتينوميسين D لمدة ساعتين قبل تحضينها مع الفيروس. اجمع الفيروس بعد ٢٤ ساعة و٤٨ ساعة من التحضين وقيم الإمراضية. قارن المعيار مع الفيروس الضابط المحصود بعد ٢٤ و ٤٨ ساعة بدون أكتينوميسين D يدل على حساسية الفيروس.

قارن المعيار مع الفيروس الضابط المحصود بعد ٢٤ - ٤٨ ساعة بدون أكتينوميسين D في الوسط. الانخفاض المعنوي في المعيار في الوسط المعالج بآكتينوميسين D يدل على أن الفيروس حساس.

ا دول رقم (٤٤,٢). مقارنة الطرق ا باشرة وغ ا باشرة صائص ا مض النووي الف وسي[٨].

ا عا ة	دي إن إيه		آر إن إيه	
	مفرد الشريط	مزدوج الشريط	مفرد الشريط	مزدوج الشريط
DNAse 1	-	+	-	-
Nuclease S1	-	-	-	-
Low NaCl RNA	-	-	+	+
High NaCl RNA	-	-	+	-
NaOH 0.3 mol	-	-	+	+
مثيلات ثيميدين	-	+	-	-
أكتينوميسين	-	+	+	+

[٨] (+) = الهضم أو التثبيط ، (-) = عدم الهضم أو التثبيط.

ا ساسية ذيبات الدهون Sensitivity to Lipid Solvents

ترتبط حساسية الفيروس لمذيبات الدهون مع ما إذا كان يحتوي على غلاف بروتيني دهني أم لا. تستخدم مذيبان للدهون (الإيثير والكلوروفورم) لمعالجة الفيروسات وتحديد تأثيرها على تدمير القدرة الإمراضية للفيروس.

ا ساسية للإيثر Sensitivity to Ether

أضف إيثيل الإيثير ٢٠٪ بالحجم إلى كمية معينة من الفيروس في أنبوبة بغطاء حلزوني. أغلق الأنبوبة بشريط. جهز فيروساً ضابطاً مع ٢٠٪ بالحجم من كلوريد الصوديوم ٠,٨٥٪. ضع الأنابيب عند ٤ °م لمدة ١٨ — ٢٤ ساعة، ورج الأنابيب يدوياً عدة مرات أثناء هذا الوقت. اسكب محتويات كل أنبوبة إلى طبق بتري معقم، واترك الإيثير ليتبخر. قيم كل فيروس. فقد الإمراضية في الفيروس المعالج بالإيثير للوغاريتم ١٠ أو أكثر يدل على أن الفيروس له غلاف (1).

ا ساسية للكلوروفورم Sensitivity to Chloroform

أضف ٠,٠٥ مل من الكلوروفورم على ١ مل من الفيروس. الفيروس الضابط يتكون من ١ مل من الفيروس و٠,٠٥ مل من كلوريد صوديوم ٠,٨٥٪ ويجب تجهيزه في نفس الوقت. رج كلتا الأنبوبتين لعشرة دقائق

واطرد مركزياً ٥ دقائق عند ٣٣ إكس جي. استخدم الطبقة العليا لقياس إمراضية الفيروس. فقد الإمراضية للوغاريتم١٠ أو أكثر يدل أن الفيروس له غلاف (5).

قطر الف وس Diameter of the Virion

باستعمال المجهر الإلكتروني النافذ يمكن تقدير حجم الفيروس باستخدام المرشحات الغشائية المتوفرة بمتوسط قطر فتحات ٤٥٠ و ٣٠٠ و ٢٠٠ و ١٠٠ و ٥٠ نانومتراً. تؤثر عدة عوامل على نتيجة ترشيح الفيروس منها التجمع، وتعدد الشكل، وانسداد الفتحات ببقايا الخلايا، والشحنات الكهربية الساكنة على المرشح. ترشيح عينة الفيروس خلال مرشح أولي و/أو مرشح ٤٥٠ نانومتراً يقلل النتائج الغريبة التي يسببها تجمع بقايا الخلايا ويفضل غمر أو نقع المرشح الأولي في مصل عجول او تمريرها عليه (٥ مل من مصل عجول ١٠٪ في محلول ملح) لمعادلة الشحنات على الغشاء. الطريقة هي كالتالي:

١) نقِّ معلق الفيروس بالطرد المركزي لعشر دقائق عند ٢٠٠ إكس جي و/أو مرر المعلق خلال وسادة مرشح أولي للتنقية واحفظ العينة للقياس.

٢) مرر العينة خلال مرشح ٢٠٠ نانومتراً متصل بمحقن وتُشترى المرشحات غير معقمة ويجب تعقيمها بالأوتوكلاف واحفظ العينة للتحليل.

٣) مرر ٢٠٠ نانومتراً من الراشح خلال مرشح ١٠٠ نانومتراً واحفظ العينة للتحليل ثم مرر الباقي خلال مرشح ٥٠ نانومتراً. الراشح من كل المرشحات يقاس عند ذلك ويقارن المعيار بالمعلق المنقى الأصلي.

٤) قد يكون حجم الفيروس حتى ١,٢ مرة لمتوسط قطر الفتحات على المرشح التي من خلالها لا يمر الفيروس.

٥) لاختبار صلاحية المرشح يمكن تمرير مزرعة بكتيريا خلال المرشح مباشرة عقب تجهيز الفيروس واختبر الراشح لتعقيمه.

اثل الكابسيد النووي Symmetry of the Nucleocapsid

يجب أن يحدد بالمجهر الإلكتروني النافذ وليس ضرورياً تحديد التصنيف الأولي للفيروس. يعطي المجهر الإلكتروني النافذ تقريباً كل المعلومات المطلوبة لتعريف وتصنيف الفيروس وهي: الغلاف البروتيني الدهني، والحجم، والشكل. Doane و Anderson (4) قاما بنشر دليل ممتاز وأطلس للمجهر الإلكتروني للفيروسات. الطريقة الأساسية تشمل تركيز الفيروس بالطرد المركزي فائق السرعة وإعادة تعليق الفيروس في ماء مقطر منخفض الملح أو خالٍ منه. عند ذلك توضع قطرة من الفيروس على شبكة مغطاة بالبلاستيك وتخلط مع نقطة من ٢٪ حمض فوسفوتنجستيك في ماء مقطر (اضبط رقم الحموضة عند ٦,٥ بواسطة هيدروكسيد بوتاسيوم ١ عياري). تركيزات

الفيروس ١٠^٦/مل أو أكثر يجب أن توجد لكشف الفيروس بهذه الطريقة. يوضح الجدول رقم (٤٤,٣) الصفات التي يمكن أن تستخدم للتفريق بين عائلات الفيروسات الأكثر أهمية لعوائل الدواجن. بعد وضع الفيروس في عائلة يجب أن يصنف أكثر بوسائل أخرى. التعرف المصلي يكون أكثر تخصصاً ويكون لتقنيات تعادل الفيروس، والترسيب في الهلام، وتثبيط التلازن، وتثبيت المتمم، والإليزا أهمية قصوى للتعرف على الفيروسات النوعية. نوقشت هذه التقنيات في أماكن عدة في هذا الكتاب.

ا دول رقم (٤٤,٣). ا صائص ا فرقة لعائلات ف وسات دي إن إيه وآر إن إيه ال ثل أ ية أمراض الطيور.

I حساس لمثيلات ثيميدين	فيروس دي إن إيه
أ- حساس للإيثير	
١- يمر من مرشح ٢٠٠ نانوميتر	عائلة فيروسات هيربس
٢- يحتجز بمرشح ٢٠٠ نانوميتر	عائلة فيروسات الجدري[A]
ب- مقاوم للإيثير	
١- يحتجز بمرشح ٥٠ نانوميتر	عائلة فيروسات أدينو
٢- يمر من مرشح ٥٠ نانوميتر	عائلة فيروسات بارفو
	عائلة فيروسات بابوفا
٣- يحتجز بمرشح ٢٠٠ نانوميتر	عائلة فيروسات جدري[A]
II مقاوم لمثيلات ثيميدين	**فيروسات آر إن إيه**
أ- حساس للإيثير	
١- إيجابي لتلازن الدم	
أ. حساس لأكتينوميسين D	عائلة فيروسات أورثوميكسو
ب. مقاوم لأكتينوميسين D	عائلة فيروسات باراميكسو
٢- سلبي لتلازن الدم	
أ. حساس لأكتينوميسين D	عائلة للفيروسات الارتدادية
ب. مقاوم لأكتينوميسين D	عائلة للفيروسات التاجية
	عائلة فيروسات فلافي[B]
ب- مقاوم للإيثير	
١- حساس لأكتينوميسين D	عائلة فيروسات ريو[C]
	عائلة فيروسات بيآر إن إيه[C]
٢- مقاوم لأكتينوميسين D	عائلة فيروسات بيكوآر إن إيه[B]

[A] قد تدمر فيروسات الجدري أو لا بالإيثير و/أو الكلوروفورم.

[B] يمر من مرشح ٥٠ نانوميتراً.

[C] ينخفض المعيار بشدة بمرشح ٥٠ نانوميتراً.

References المراجع

1. Andrews, C., and D. Horstmann. The susceptibility of viruses to ethyl ether. J. Gen. Microbiol. 3:290-296. 1949.
2. Berger, S. L., and A. R. Kimmel. Methods in enzymology. Vol. 152. Guide to molecular cloning techniques. Academic Press, New York. 1987.
3. Chirgwin, J. M., A. E. Przybia, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18:5294-5299. 1979.
4. Doane, F. W., and N. Anderson. Electron microscopy in diagnostic virology. Cambridge University Press, New York. 1987.
5. Feldman, H., and S. Wang. Sensitivity of various viruses to chloroform. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106:736-738. 1961.
6. Fields, B. N., and D. M. Knipe, eds. Fields virology, 2nd ed. Raven Press, New York. pp. 9-14. 1990.
7. Grimberg, J., S. Nawoschik, L. Belluscio, R. McKee, A. Turck, and A. Eisenberg. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Res. 17:8390. 1989.
8. Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers, eds. Virus taxonomy, sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wien, New York. 1995.
9. Puissant, C., and L. M. Houdebine. An improvment of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyantate-phenol-chloroform extraction. BioTechniques 8:148-149. 1990.
10. Rovozzo, G. C., and C. N. Burke. A manual of basic virological techniques. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1973.
11. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning-a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
12. Wiedbrauk, D. L., and D. H. Farkas. Molecular methods for virus detection. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 41-43, 1995.



الفصل الخامس والأربعون

معايرة المعلقات البيولوجية
TITRATION OF BIOLOGICAL SUSPENSIONS

بيدرو فيليجاس
Pedro Villegas

الملخص Summary

تشمل طرق معايرة المعلقات البيولوجية للفيروسات الطريقة المقررة بواسطة ريد ومونش Reed and Muench وبواسطة Spearman-Kärber. يكون الاختيار الأنسب للعائل المراد حقنه ومدى التخفيف أيضا اعتباراً مهماً لضمان النتائج الموثوقة.

المقدمة Introduction

يقاس نشاط المعلق البيولوجي مثل الفيروس كيفياً بالطرق التي تتكون من تحضير تخفيفات من المعلق وتحديد التخفيفات التي عندها يظل النشاط البيولوجي مُكتشفاً. لعمل التخفيفات لاختبار الإمراضية للمعلق البيولوجي أو الفيروسي يجب اعتبار القواعد التالية.

المخففات Diluents

عند تخفيف الفيروس يجب أن يحفظ المخفف إمراضية الفيروس ويكون غير سام للعائل. يمكن استخدام محلول ملح متوازن أو وسط مزرعة الخلية لأنظمة مزرعة الخلية والشوربة المغذية أو شوربة التربتوز لأجنة البيض لمعظم الفيروسات. ينصح بإضافة ٢٪ - ٥٪ من المصل مع الفيروسات شديدة التأثر على الرغم من حتمية اختبار المصل قبل استخدامه لخلوه من النشاط المضاد للفيروس.

تجهيز التخفيفات Preparation of Dilutions

يجب استخدام ماصات منفصلة معقمة لكل معلق على الرغم من إمكانية استخدام نفس الماصة لمزج ونقل التخفيف المفرد. بعد نقل الحجم المطلوب من الخليط إلى الأنبوبة التالية، تغير الماصة. أثناء تحضير التخفيف يجب حفظ كل الكواشف وأنابيب التجفيف المعقمة على الثلج.

إجراء الاختبار Performing the Test

ابدأ بالتركيز الأقل (أعلى تخفيف) واحقن الحجم المرغوب في كل عائل بالطريقة الخاصة به. يمكن استخدام نفس الأداة (المحقن أو الإبرة أو الماصة) لحقن تخفيفات عديدة في تسلسل عند حقن التركيز الأقل أولاً والتركيز الأعلى آخراً. يحدث غالباً النفوق غير النوعي نتيجة عملية الحقن خلال الساعات القليلة من الحقن. يعتبر النفوق حتى ١٨ - ٢٤ ساعة عقب الحقن عامة غير نوعي ويحذف من الحسابات. تخضع كل مجموعة تم حقنها للفحص المنتظم (يومياً إذا لم يُنَص على غير ذلك) ويجب تسجيل الملاحظات. عند نهاية الوقت المحدد الذي يختلف بالعامل، يفحص كل فرد ويسجل على أنه مصاب أو غير مصاب أو نافق بالمواصفات المناسبة.

أنواع التأثيرات الإمراضية Types of Infectivity Assays

يستخدم نوعان من التأثيرات الإمراضية لتعريف الفيروسات وهما: الكمي أو العددي (يعرف أيضاً بالكمي أو البؤري). في التحليل الكمي، تكون الاستجابة إما إيجابية أو سلبية، ويعتمد القياس على طريقة "الكل أو العدم": العائل حي أو ميت، ووجود أو غياب التأثير المرضي الخلوي، وأعراض أو آفات الإصابة ملحوظة أو غير موجودة، وهكذا. في الاستجابة العددية يمكن تقييم عدد الفيروسات المعدية الموجودة في المعلق البيولوجي.

التحليل الكمي Quantal Assays

لعمل ذلك تحقن تخفيفات متسلسلة من الفيروس في عائل مناسب. بعد أزمنة تحضين متفاوتة، عند كل تخفيف، يقيم العائل و يحدد إما موجب أو سالب لتأثير الفيروس. تسجل نسبة العوائل الموجبة وتستعمل لحساب التركيز أو معيار المعلق الفيروسي.

وحدة الإمراضية المستخدمة للتعبير عن النتائج للتأثير الكمي هي متوسط الجرعة الممرضة التي تصيب ٥٠٪ من العوائل (ID_{50}). عندما يعتمد التأثير على الأثر المميت يستعمل مصطلح متوسط الجرعة المميتة لـ ٥٠٪ من العوائل (LD_{50}). كل من LD_{50} و ID_{50} تمثلان معيار المعلق البيولوجي الذي يعبر عادة عن عدد الوحدات المعدية لكل وحدة حجم (عادة ١ مل). ID_{50} هي الطريقة المعتمدة للتعبير عن إمراضية العامل. تستخدم أيضاً وحدات أخرى للإمراضية (الجرعة الممرضة المتوسطة للجنين [EID_{50}]، ومتوسط الجرعة الممرضة لمزرعة النسيج [$TCID_{50}$]).

حساب ا عيار Calculation of Titers

بعد إجراء المعايرة وتحديد عدد العوائل التي تأثرت من كل تخفيف، ويجب تحديد تخفيف نقطة النهاية والذي يعرف كأعلى تخفيف من الفيروس الذي يحدث تأثيراً ملحوظاً في ٥٠٪ من العوائل المحقونة. لا يمكن تحديد نقطة النهاية بالفحص المرئي للبيانات لذلك تحدد حسابياً. تم وصف عدة طرق حسابية (7, 6, 5, 4, 3, 1).

طريقة ريد ومونش Method of Reed and Muench

معادلة ريد ومونش (7) تسمح بتقييم نقطة النهاية ٥٠٪ من البيانات المشتقة من الاستجابة الكمية ومجاميع المعلقات المختبرة. يعطي الجدول رقم (٤٥,١) مثالاً للتطبيق على حقن فيروس مميت في أجنة البيض. يمكن أن تطبق المعادلة بطريقة مشابهة لمعدلات الإصابة في أي نظام عائل.

ا دول رقم (٤٥,١). مثال على ديد نقطة النهاية ٥٠٪ بطريقة ريد ومونش.

فيف الف وس ا قون	الأجنة		الأعداد التراكمية		ا عدل ا يت/الكلي	نسبة ا يت
	العدد ا يت	العدد ا ي	ا يت	ا ي		
$١٠^{-٣}$	٥	صفر	١٢ ↑	صفر ↓	١٢/١٢	١٠٠
$١٠^{-٤}$	٤	١	٧	١	٧/٨	٨٨
$١٠^{-٥}$	٢	٣	٣	٤	٣/٧	٤٣
$١٠^{-٦}$	١	٤	١	٨	١/٩	١١

ينص العمود الأول في الجدول على التخفيفات المحقونة، والعمود الثاني يصف عدد الأجنة الميتة، وينص العمود الثالث على عدد الأجنة الحية. يوضح العمودان التاليان الأعداد التراكمية للأجنة الميتة المحسوبة بافتراض أنه إذا أصيب العائل أو النظام عند تخفيف معين فإنه يجب أن يتأثر أيضاً عند التخفيف التالي الأقل والذي به تركيز أعلى للفيروس. وبطريقة مشابهة تحسب الأعداد التراكمية للأجنة الحية أو غير المتأثرة على أساس أنها إذا لم تتأثر عند تخفيف معين فإنها يجب أن لا تتأثر عند التخفيف الأعلى التالي الذي به تركيز أقل من الفيروس. بسبب هذا الافتراض، يضاف عدد من الأجنة المصابة بداية عند التخفيف الأعلى وعدد الأجنة غير المصابة يضاف بداية عند التخفيف الأقل.

بمجرد حساب الأعداد التراكمية، يحسب معدل العدد الميت على العدد الكلي للعوائل المحقونة لكل تخفيف. تحسب النسبة ويحدد التخفيفان اللذان يحصران بينهما نقطة النهاية ٥٠٪. في المثال السابق نقطة النهاية ٥٠٪ تكون بين $١٠^{-٤}$ (٨٨٪) و $١٠^{-٥}$ (٤٣٪). تستعمل المعادلة التالية لحساب المسافة النسبية بين $١٠^{-٤}$ و $١٠^{-٥}$:

المسافة النسبية (PD) = النسبة المصابة عند تخفيف تالي أعلى من ٥٠٪ - ٥٠٪ / النسبة المصابة عند تخفيف تالي فوق ٥٠٪ - النسبة المصابة عند تخفيف تالي أقل ٥٠٪

PD = (٨٨ - ٥٠) / (٨٨ - ٤٣) = ٣٨ / ٤٥ = ٠,٨٤، ~٠,٨

يمكن أن تحسب نقطة النهاية ٥٠٪ الآن باستخدام المعادلة التالية :

لوغاريتم نقطة النهاية ٥٠٪ = (لوغاريتم فوق ٥٠٪ - PD x لوغاريتم معامل التخفيف

= -٤ – (٠,٨ x ١,٠) = ٤,٨

لذلك، نقطة النهاية ٥٠٪ تكون ١٠ $^{-٤,٨}$ وليس لها وحدات.

يعرف المعيار بعدد الوحدات المعدية لكل وحدة حجم. لذلك، معيار المحلول المحضر هو الأس السالب لتخفيف نقطة النهاية ويعبر LD_{50}/جرعة. إذا كانت الجرعة ٠,١ مل فإن المعيار سوف يكون ١٠ $^{-٥,٨}$ /مل.

إذا كانت التخفيفات غير عشارية القيمة، يجب أن تضرب المسافة النسبية بواسطة لوغاريتم ١٠ للعامل، على سبيل المثال، للتخفيف الخماسي القيمة مثل ١٠ $^{-١}$ و ١٠ $^{-١,٧}$ و ١٠ $^{-٢,٤}$، اضرب المسافة النسبية بواسطة ٠,٦٩٩٠ للتخفيفات الثنائية، اضرب المسافة النسبية (PD) بواسطة ٠,٣ للتخفيفات الرباعية واضرب بواسطة ٠,٦. للتخفيفات العشارية، لوغاريتم معامل التخفيف (الذي هو ١٠) يكون ١ صحيح.

طريقة سبيرمان-كاربر Method of Spearman-Kärber

يفضل العديد من الباحثين هذه الطريقة (1) لحساب ID_{50}. في معظم الحالات لا تضم هذه الطريقة عدداً كبيراً من الحسابات والنتائج تكون أدق مقارنة بتلك في طريقة ريد ومونش. يمكن أن تستخدم هذه الطريقة فقط مع البيانات التي تشمل استجابة ١٠٠٪ أو عندما تتوقع استجابة ١٠٠٪ عند الجرعة التالية الأعلى. لحساب ID_{50} بهذه الطريقة، نستعمل المعادلة المكثفة التالية :

$$ID_{50} = x + \frac{1}{2}d - \frac{d\sum r_1}{n}$$

حيث:

X =أعلى مستوى تخفيف مختبر

D = المسافة بين جرعات لوغاريتمية متتالية (معامل التخفيف)

Σr_1 = العدد الكلي للعوائل غير المصابة

n = عدد العوائل المستخدمة في كل مستوى تخفيف (ثابت)

عندما تستخدم البيانات المعطاة لحساب ID_{50} بواسطة طريقة ريد ومونش في المعادلة السابقة، تصبح المعادلة:

ID_{50} = ٦ + ١/٢ x (١) – ١(١+٣+٤) / ٥

= ٦ + ٠,٥ - (٨/٥) = ٦ + ٠,٥ – ١,٦ = ٤,٩

= ١٠^٤,٩ لكل ٠,١ مللي أو ١٠^٥,٩ لكل مللي.

عند استخدام تسلسل عشاري القيمة لحقن العوائل المناسبة، يمكن أن تختزل المعادلة لتسهيل الحسابات:

$$ID_{50} = x + 0.5 - \frac{\sum r_1}{n}$$

والسبب في هذا هو أن المسافة بين التخفيفات (d) هي لوغاريتم ١٠ أو واحد صحيح.

الاستجابة العددية Enumerative Response

اعتماداً على نظام العائل المستخدم (مثلاً الأغشية الكوريوالانتويس لأجنة البيض أو مزرعة الخلية) ونوع الاستجابة الحادثة، يعبر عن المعيار كوحدات مكونة للبقع أو وحدات مكونة للأقراص ويختصر كلاً من هذين (PFU) أو المحدات المكونة للبؤر (FFU) لكل ملليتر. في هذه الطريقة، متوسط عدد البقع من أطباق مزدوجة أو اختبارات (اثنين لكل تخفيف) يرتبط مع كمية الفيروس المضاف أو المحقون ابتداءً كالتالي:

تخفيف الفيروس = ١٠^-٥

الحجم المحقون = ٠,١ مل

عدد البقع = ١٤٥ و ١٣٨

متوسط عدد البقع = ١٤١

المستوى = ١,٤ x $١٠^{٨}$ PFU/مل

يمكن أن تستخدم مزارع الخلية في التقييم الكمي أو العددي. في حالة الوسط السائل تصيب الفيروسات التي تنتشر خارج الخلية بالتساوي كل المزرعة وتحدث تأثيراً خلوياً مرضياً أو أنتيجينات فيروسية. في التقييم الكمي، يمكن أن تقيم المزارع المزدوجة لوجود أو غياب تأثير الفيروس. يأخذ التقييم العددي ميزة حقيقة أن الفيروس المعدي يمكن أن يصيب الخلية المفردة ويتكاثر ويعطي تغيراً مستديراً في خلية الطبقة الواحدة تحت الوسط شبه الصلب أو الهلامي محدثاً استجابة عددية أو تقييماً عددياً للبقع. انتشار الفيروس خلال الوسط الرائق يجب أن يحاصر بزيادة صلابة الوسط بواسطة الآجار أو ميثيل السيلليلوز مما يؤدي إلى المساعدة أحياناً في المحافظة على أو صحة الطبقة الواحدة للخلايا الطبيعية بينما تتغير الخلايا المصابة بالفيروس. مع بعض الفيروسات يفضل إضافة صبغات حيوية مثل الأحمر المتعادل إلى الوسط الصلب أو إضافة الصبغة على سطح الوسط بعد أن يأخذ الفرصة ليتكاثر. مع فيروسات أخرى أو مزارع أخرى، يمكن إزالة الوسط الصلب ويمكن أن تثبت الخلايا وتصبغ عندئذ بالهيماتوكسيلين والإيوسين أو صبغات أخرى. في بعض التقييمات، الملاحظة المجهرية أو العينية المباشرة بدون صبغ قد تكون كافية. تحقن فيروسات عديدة على الغشاء الكوريوالانتويس لأجنة البيض محدثةً آفات مستديرة (أقراص أو بقع) والتي يمكن عدها.

التخفيفات Dilutions

للمعلقات البيولوجية، التخفيفات المستخدمة هي تلك التي فيها سائلين يتم خلطهما في معدلات مختلفة التي تكون حجم : حجم (أو حجم/حجم). في التخفيفات المصلية و الفيروسية، ١ : ٢ يعتبر تخفيفاً يتكون من حجم من المادة في إجمالي حجمين من الخليط الذي يكون حجماً واحداً من كل مكون. بالنسبة لباقي هذا الفصل، يستعمل الشكل الاضطراري (مثلاً ١ : ٢) أكثر من التقليدي (مثلاً ١/٢). يتكون التخفيف ١ : ١٠ يتكون من حجم واحد من الكاشف البيولوجي وتسع أحجاماً من المخفف.

يستعمل التخفيف التسلسي لتحديد معيار الفيروس بدقة وهو يستخدم عامة باستعمال عوامل ٢ أو ٥ أو ١٠. والتخفيف المتسلسل الأكثر شيوعاً في فيروسات الدواجن هو التخفيف عشاري القيمة على الرغم أن الأكثر إدراكاً هو الأصغر عاملاً، والمعيار الأكثر تحديداً يعتمد على الحجم النهائي المطلوب والتخفيف العشاري المتسلسل ويمكن استخدامه بتحضير أحجام ثابته من ٩ أو ٤,٥ أو ٠,٩ مل من المخفف.

ويل ا عيار إ فيف Conversion of Titer to Dilution

يمكن استخدام المعادلة التالية لتحويل محلول أكثر تركيزاً معلوم المعيار أو التركيز إلى محلول أكثر تخفيفاً :

$$C \times V = C' \times V'$$

حيث :

C = المعيار أو التركيز الأصلي أو الأساسي

V = الحجم الأساسي

C′ = المعيار أو التركيز المطلوب أو النهائي

V′ = الحجم المطلوب أو النهائي

على سبيل المثال : محلول فيروس بمعيار $١٠^{٥}$ EID_{50}/مل مطلوب لحقن ٦٠٠ دجاجة بجرعة $١٠^{٣}$ EID_{50} في ٠,١ مل/دجاجة.

الخطوة الأولى ليجعل معيار الفيروس مُعبراً عنه بنفس وحدة الحجم. لذلك، يجب أن يحسب معيار الفيروس لكل ٠,١ مل، الذي يكون $١٠^{٤}$ EID_{50} لكل ٠,١ مل. الآن يمكن أن تطبق المعادلة كالتالي :

$$١٠^{٤} \times V = ١٠^{٣} \times (٠,١ \times ٦٠٠)$$

$$V = \frac{١٠^{٣} \times ٦٠}{١٠^{٤}} = ٦$$

إجمالى ٦ مل من محلول الفيروس الأساسي يجب أن يؤخذ إلى حجم نهائي ٦٠ مل. ينصح دائماً بإعداد كميات إضافية من الفيروس. يمكن أن تستخدم المعادلة السابقة أيضاً عندما يعبر عن التركيزات كنسب (١ :٨، ١ :١٥)، على الرغم أنه من الأسهل تحويل الكسور إلى نسب وعندئذ تطبق المعادلة.

ديد عدد الوحدات ا عدية Determining Number of Infectious Units

عند معلومية الفيروس تحديد عدد الوحدات المعدية يجب أن يتم الحصول عليها، ويمكن استخدام طرق عديدة لإيجاد التخفيف الصحيح للفيروس. في المثال التالي، الطريقة باستخدام اللوغاريتم بخطوة stepwise method تستعمل لإيجاد التخفيف الصحيح. يجب أن يحقن نظام العائل في المعمل بـ ١٠٠٠ ID_{50}/مل من تحضير الفيروس الذى له معيار $١٠^{٥,٤}$ ID_{50}/مل.

طريقة باستخدام اللوغاريتمات Method Using Logarithms

يقسم عدد $ID_{50}s$ المطلوب إلى معيار الفيروس:

١٠ ^٥٫٤^ مستوى الفيروس لكل ميلليتر

÷ ١٠^٣^ كمية الفيروس المطلوبة في ١ مل

= ١٠^٢٫٤^ أو ٢٫٥ (عكس لوغاريتم ٠٫٤) x ١٠^٢^

هذا الشكل من الأس السالب يمثل التخفيف الذي يجب عنده أن يخفف المحلول الأساسي للحصول على ١٠٠٠ ID_{50}. يمكن أن يحضر تخفيف ١٠^-٢^ ويؤخذ منه ١ مل حتى حجم نهائي ٢٫٥ مل للحصول على ID_{50} الصحيحة. لو أُلغي الكسر العشري في المعيار، يجب حساب عكس لوغاريتم ٠٫٤. هذا عكس لوغاريتم يقابل ٢٫٥، وبالتالي:

١٠^٥٫٤^ = ٢٫٥ x ١٠^٥^ ID_{50}/مل.

طريقة الخطوة Stepwise Method

طريقة الخطوة بخطوة التالية يمكن أن تستخدم لإيجاد التخفيف المحتوي على ١٠٠٠ ID_{50} في ١مل من الطعم:

١ مل من تخفيف ١٠^صفر^ يحتوي ١٠^٥٫٤^ أو ٢٫٥ x ١٠^٥^ ID_{50}

١ مل من تخفيف ١٠^-١^ يحتوي ١٠^٤٫٤^ أو ٢٫٥ x ١٠^٤^ ID_{50}

١ مل من تخفيف ١٠^-٢^ يحتوي ١٠^٣٫٤^ أو ٢٫٥ x ١٠^٣^ ID_{50} أو ٢٥٠٠ ID_{50}

عند هذه النقطة، المعادلة $V' \times C' = V \times C$ يمكن أن تستخدم كالتالي: عندما

C = ٢٥٠٠ ID_{50}

V = ١ مل (بافتراض أن ١ مل فقط يجب أن يؤخذ من المعلق النهائي)

C′ = ١٠٠٠ ID_{50}

V′ = غير معلومة

باستعمال المعادلة السابقة: ٢٥٠٠ x ١ = ١٠٠٠ x V′، و V′ = ٢٫٥

لذلك، ١ مل من تخفيف ١٠^-٢^ من الفيروس يجب أن تؤخذ حتى حجم نهائي ٢٫٥ مل، الذي هو ١٫٥ مل من المخفف و١ مل من تخفيف ١٠^-٢^ من الفيروس.

حساب معيار ا توسط ا ندسي Calculation of Geometric Mean Titers

عـادة يعبر عن النتـائج المصلية الفردية بمقلـوب نقطة نهاية تخفيف المصل. يستخدم هـذا النظـام لمسلسل التخفيف الثنائي الذي يبدأ مع إما التخفيف العشاري أو الثنائي. مثال لهـذه النتـائج ١٠ ، ٢٠ ، ٤٠ ، ... ، ٣٢٠، أو ٢ ، ٤ ، ٨ ، ... ، ٢٥٦. هذه النتائج عـادة تعبر بمصطلحات هندسية الـتي يمكن أن تكون مفيدة عند تقييم نتائج عينـات مصل قليلـة. في حالـة الأعـداد الكبيرة تـصبح الطريقـة الـسابقة مكلفـة جداً للوقـت. أيضاً العينات القليلة بمستويات عالية جداً أو قليلة جداً سوف تعطي متوسط هندسياً غير منطقي والذي يمكن أن يكون مضللاً عند تقييم النتـائج. توجد معظم النتـائج المصلية في الأبحاث كمعـايير متوسط هندسي على الـرغم أنهـا تعبر في مـصطلحات حسابية. بالتالي تكون معرفة الطرق لحساب المتوسط الهندسي مهمة. المعادلة العامة لحساب المتوسط الهندسي هي :

$$GM = \sqrt[n]{X_1 X_2 X_3 \ldots X_n}$$

حيث x = قيمة الملاحظة ، و n = عدد الملاحظات. يمكن تحديد المتوسط الهندسي بعدد من الطرق التالية.

طريقة تستخدم مستويات اللوغاريتم العاشر لو١٠ Method Using Log_{10} Titers

قاعدة لو١٠ لمقلوب المستوى لكل عينة تجمع ويقسم المجموع على العـدد الكلي للعينات. يمثل العـدد النـاتج لوغاريتم المتوسط الهندسي. سوف يكون مستوى المتوسط الهندسي عكس اللوغـاريتم للعـدد النـاتج. على سبيل المثال نتيجة اختبار منع تلازن الدم من ٢٠ عينة مصل كانت كالتالي (المعيار معبراً عنه كمقلوب تخفيف المصل) : ست عينات بمعيار ٥ ، و٧ عينات بمعيار ٢٠ ، و٥ عينات بمعيار ٤٠ ، وعينتين بمعيار ٨٠. لإيجاد المتوسط الهندسي للوغاريتم ١٠ :

(١) لوغاريتم١٠ ٥ = ٠,٦٩٨ x ٦ = ٤,١٩٣

لوغاريتم١٠ ٢٠ = ١,٣٠١ x ٧ = ٩,١٠٧

لوغاريتم١٠ ٤٠ = ١,٦٠٢ x ٥ = ٨,٠١٠

لوغاريتم١٠ ٨٠ = ١,٩٠٣ x ٢ = ٣,٨٠٦

(٢) أضف كل النتائج الجزيئية واقسم على العدد الكلي للعينات :

٤,١٩٣ + ٩,١٠٧ + ٨,٠١٠ + ٣,٨٠٦ = ٢٥,١١٦ ÷ ٢٠ = ١,٢٥٥٨

والتي تمثل لوغاريتم المتوسط الهندسي.

(٣) أوجد عكس اللوغاريتم ١,٢٥٥٨ = ١٨,٠٢ = مستوى المتوسط الهندسي.

طريقة باستخدام عدد الأنبوبة (لوغاريتم٢ ا عدل) وا داول

Method Using Tube Number (Modified Log_2) and Tables

عند تسجيل نقطة نهاية التخفيف للاختبارات المصلية بواسطة رقم الأنبوبة واستعمال أي مسلسل تخفيف، يمكن أن يحسب المتوسط الهندسي بسهولة بالرجوع إلى الجدول الموضوع بواسطة Brugh (2) (الجدول رقم ٤٥,٢). يمكن حساب معيار المتوسط الهندسي عندما يكون التخفيف الأساسي إما ١ : ٢ أو ١ : ٥ أو ١ : ١٠ أو ١ : ٢٠.

ا دول رقم (٤٥,٢). وبل قاعدة لوغاريتم٢ توسط ا عاي إ متوسط معاي هندسية.

Mean titer[A]			Reciprocal of GMT at proportionate distance between dilutions.									
1:5	1:10	1:20	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
1	—	—	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9
2	1	—	10	11	12	12	13	14	15	16	17	19
3	2	1	20	21	23	25	26	28	30	32	35	37
4	3	2	40	43	46	49	53	57	61	65	70	75
5	4	3	80	86	92	98	106	113	121	130	139	149
6	5	4	160	171	184	197	211	226	243	260	279	299
7	6	5	320	343	368	394	422	453	485	520	557	597
8	7	6	640	686	733	788	844	905	970	1040	1114	1194
9	8	7	1280	1372	1470	1576	1689	1810	1940	2079	2229	2389
10	9	8	2560	2744	2941	3152	3378	3620	3880	4159	4457	4777
11	10	9	5120	5487	5881	6303	6756	7241	7760	8317	8914	9554
12	11	10	10,240	10,975	11,763	12,607	13,512	14,482	15,521	16,635	17,829	19,109
13	12	11	20,480	21,950	23,525	25,214	27,024	28,963	31,042	33,270	35,658	38,217
14	13	12	40,960	43,900	47,051	50,428	54,047	57,926	62,084	66,540	71,316	76,434
15	14	13	81,920	87,800	94,101	100,856	108,094	115,852	124,168	133,079	142,631	152,868
16	15	14	163,840	175,599	188,203	201,711	216,188	231,705	248,335	266,159	285,262	305,736

[A] يعبر عن متوسط نقطة نهاية المعيار بالتخفيف أو رقم الأنبوبة. تخفيف مادة الاختبار (مثلاً المصل) في الأنبوبة الأولى من التسلسل المزدوج. للقياسات بتخفيف أولي ١ : ٢، استخدم العمود ١ : ٢٠ واقسم النتائج على ١٠.

اعتماداً على أيها التخفيف الأساسي المستخدم، يمكن الحصول على العدد الكلي الناتج من متوسط أعداد الأنابيب الموجود في واحد من ثلاثة أعمدة على الجانب الأيسر للجدول رقم (٤٥,٢). يوجد الرقم العشري غالباً في رؤوس العمود لباقي الجدول. على سبيل المثال إذا كان التخفيف الأساسي المستخدم في اختبار منع التلازن لعدد ١٠ عينات مصلية هو ١ : ٥، فتسجل النتائج برقم الأنبوبة كالتالي:

عينتين بنقطة نهاية في الأنبوبة ٣، و٣ عينات بنقطة نهاية في أنبوبة ٤، و٤ عينات بنقطة نهاية في أنبوبة ٥، وعينة واحدة بنقطة نهاية في أنبوبة ٦. متوسط رقم الأنبوبة:

(٢ x ٣) + (٣ x ٤) + (٤ x ٥) + (١ x ٦) = ٤٤

٤٤ ÷ ١٠ = ٤,٤٠

العدد الكلي ٤ يوجد في العمود تحت تخفيف ١ : ٥ والكسر العشري ٠,٤ يوجد على اليمين من الجدول. يكون المتوسط الهندسي من الجدول هو ٥٣. هذه الطريقة مفيدة جداً، خاصة عند استعمال الأدوات الأوتوماتيكية وعدد كبير من العينات يتم اختبارها.

الطريقة ا سابية لأي معامل فيف Arithmetic Method for Any Dilution Factor

يمكن حساب المعيار حسابياً للتخفيف الثنائي أو لأى تخفيفات أخرى من المعادلة التالية :

المتوسط الهندسي = عكس اللوغاريتم (متوسط نقطة النهاية لرقم الأنبوبة – ١) x (لوغاريتم العامل) + (لوغاريتم مقلوب أول تخفيف)

في المثال السابق :

المتوسط الهندسي = عكس اللوغاريتم (٤,٤ – ١) x (٠,٣٠١٠٢) + (لو٥)

= عكس لوغاريتم ١,٠٢٣٤ + ٠,٦٩٩٠

= عكس لوغاريتم ١,٧٢٢٤

= ٥٢,٧٧ = ٥٣

ا راجع References

1. Brian W. J., and H. O. Kangro. Virology methods manual. Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996.
2. Brugh, M. A., Jr. A simple method for recording and analyzing serological data. Avian Dis. 22:362-365. 1978.
3. Burleson, F. G., T. M. Chambers, and D. L. Wiedbrauk. Virology—a laboratory manual. Academic Press, Inc., San Diego, California 1992.
4. Campbell, J. M., and J. B. Campbell. Laboratory mathematics: medical and biological applications, 3rd ed. The C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo. 1984.
5. Cottral, G. E., ed. Manual of standardized methods for veterinary microbiology. National Academy of Sciences, National Research Council, Washington, D.C. p.731. 1978.
6. Hsiung, G. D. Diagnostic virology. Yale University Press, New Haven, Conn. 1982.
7. Reed, L. J., and H. Muench. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497. 1938.
8. Villegas, P., and H. G. Purchase. Titration of biological suspensions. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd ed. H. G. Purchase, L. H. Arp., C. H. Domermuth, and J. E. Pearson, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Penn. pp. 186-191. 1989.


obeikandl.com

الفصل السادس والأربعون

الطرق المصلية

SEROLOGICAL PROCEDURES

ستيفان ج. ثاير، وتشارلز و. ﺑ د

Stephan G. Thayer and Charles W. Beard

الملخص Summary

يتكون الفحص المصلي للطيور من اتحاد طرق الاختبار الكلاسيكية مثل اختبار الترسيب في الآجار واختبار التلازن الشريحي واختبار تعادل الفيروس ومنع تلازن الدم، مع التقنيات الجديدة مثل الإليزا. معظم الاختبارات سهلة التطبيق نسبياً لكن يكون ضبط الجودة مهماً وأساسياً.

يعرف أيضاً اختبار الترسيب في الآجار (AGP) باختبار الانتشار المناعي في هلام الآجار (AGID) أو اختبار الانتشار المناعي المزدوج (DID)، وهو الأبسط في الإعداد، ويتطلب فقط أمصالاً ضابطة إيجابية وسالبة، وأنتيجيناً مركزاً والآجار المناسب. يمكن أن تكتشف الأجسام المناعية للعوامل المرضية مثل فيروس إنفلونزا الطيور وفيروس النزف المعوي والأدنيوفيروس بهذه الطريقة.

تستخدم اختبارات تلازن الطبق كاختبارات استكشافية للسالمونيلا بللورم وجالينيرم والأنواع الأخرى من السالمونيلا وأنواع ميكوبلازما. تتطلب هذه الاختبارات أنتيجيناً مصبوغاً أو غير مصبوغ يختلط مع إما الدم الكامل (سالمونيلا بللورم جالينيرم) أو المصل (ميكوبلازما). إنه من الضروري إجراء اختبارات تأكيدية لأن اختبارات التلازن يمكن أن تعطي تفاعلات إيجابية زائفة أو سالبة زائفة.

اختبار تعادل الفيروس هو الأكثر إجهاداً ويحتاج للخبرة في تداول الفيروسات الحية أو تقنيات مزرعة الخلية أو طرق حقن الأجنة وتقييم التغيرات المرضية الخلوية أو التأثيرات المرضية في الأجنة النامية. يمكن أن تقيم الأجسام المضادة للأمراض الفيروسية المختلفة مثل مرض البيرسا المعدي وفيروس التهاب المفاصل وبعض فيروسات الأدينو بهذه الطرق. تفضل اختبارات تعادل الفيروس غالباً لأنها تميل أن تكون أكثر قرباً في انعكاس التعادل الفيروسي داخل الخلية الحية.

اختبار منع تلازن الدم يستخدم لمعايرة الأجسام المضادة لأمراض الطيور مثل فيروس مرض نيوكاسل وإنفلونزا الطيور والالتهاب الشعبي وفيروس أدينو ١٢٧ وميكوبلازما. تلازن الدم هو نشاط طبيعي لفيروسات إنفلونزا الطيور وفيروسات نيوكاسل وأدينو ١٢٧. ويمكن أن يُسْتَحث مع فيروس الالتهاب الشعبي بالمعاملة ما قبل بواسطة إنزيم نيورامينيداز.

يمكن أن تستخدم الإليزا لعمل معايرة الأجسام المضادة لعدد كبير من عوامل المرض الفيروسية والبكتيرية في الطيور. تتوافر الأطقم تجارياً وتقدم ميزة للبروتكول المفرد لعمل اختبارات متعددة على نفس العينة. يستخدم طبق صغير به ٩٦ حفرة كما يمكن جعل الاختبار نصف أوتوماتيكياً باستخدام غسالات للطبق وكمبيوتر للتحكم في قارئ الطبق الصغير.

مقدمة Introduction

يناقش هذا الفصل الطرق المصلية الأكثر استخداماً في مجال طب الطيور. لا تعطينا المناقشة خطوات محددة لتتبع كل الأمراض لأن الاختبارات تختلف باختلاف المرض وباختلاف النظام المعملي هل يعمل على أساس ماكرو أو ميكرو. ويضم هذا الفصل المعلومات التي يمكن أن تستعمل مع التوصيات النوعية المصلية الأخرى في فصول المرض السابق شرحها وفي البحوث الأخرى لعمل التقنية المرغوبة بشكل أكثر دقة ومتكرر النتائج.

الاقتراحات التالية قد تساعد في الحصول على مصل نظيف في كميات مناسبة :

١) استعمل أنابيب من السيليكون المشطوف (33). يمكن أن تشترى أو تعامل بالسيليكون في المعمل.

٢) لا تملأ الأنبوبة لأكثر من ربع طاقتها إذا لم تستعمل أوعية جمع الدم مثل تلك المزودة بحبيبات بلاستيكية للمساعدة في فصل المصل.

٣) بعد تغطية الأنبوبة ، ضعها في الوضع الأفقي أو قريباً إلى ذلك.

٤) احفظ عينات الدم دافئة أثناء طريقة الإدماء ، واستعمل الحرارة من لمبة إضاءة أو وسائل أخرى.

٥) ضع العينات أفقياً في حضان عند درجة ٣٧°م لعدة ساعات.

٦) اترك العينة رأسياً عند درجة الغرفة أو في المبرد (٤°م) طوال الليل. يمكن أن يسكب المصل بحرص في عبوات أو يسحب في أطباق تخزين مصل دقيقة (31). تحوير طريقة أخذ عينات الدم بورق الترشيح (10) تجعل هذه التقنية خاصة مناسبة للفحص المصلي الدقيق في الدواجن.

اختبار منع تلازن الدم Haemagglutination-Inhibition (HI)

تشمل فيروسات الدواجن التي تلزن خلايا الدم الحمراء فيروس مرض نيوكاسيل وفيروس الإنفلونزا وفيروس الالتهاب الشعبي المعدي (بعد التركيز ومعاملة الإنزيم) وفيروس أدينو ١٢٧. تستطيع عدة أنواع ميكوبلازما أيضاً أن

تلزن الدم. تثبيط التلازن بالأجسام المضادة النوعية هي أساس هذا الاختبار. هذا الاختبار هو وسيلة مصلية تقليدية واقتصادية تطبق بكثرة في أمراض الدواجن العديدة عن طريق قياس الاستجابة للتحصين وأدلة ما بعد العدوى.

المكونات الأساسية للاختبار هي الأنتيجين الملزن للدم والمصل المخفف بتسلسل متناقص التركيز ومعلق خلايا الدم الحمراء. يمكن أن يجرى الاختبار في أنابيب أو أطباق اختبار دقيقة. تستعمل طريقة بيتا (أنتيجين ثابت مصل مخفف) أكثر من طريقة ألفا (مصل ثابت أنتيجين مخفف).

يختلف تحضير الأنتيجين الملزن للدم اعتماداً على المعمل والعامل الممرض. إنه يمكن أن يكون بسيطاً مثل فيروس نيوكاسيل في سوائل البيض ٤٨ - ٧٢ ساعة بعد الحقن أو معلق مركز من ميكروب ميكوبلازما.

وصفت طريقة تحضير أنتيجين النيوكاسيل (6). عند جمع سوائل البيض يجب تبريد البيض عند ٤ °م لعدة ساعات لتقليل فرصة تلوث السوائل بخلايا الدم الحمراء. تتراوح كمية الأنتيجين المستعمل لكل حفرة في الاختبار من ٨ – ١٠ وحدات تلازن دم للنيوكاسيل و٤ وحدات للإنفلونزا حتى ٢ – ٤ وحدات للميكوبلازما، ويعتمد تخفيف الأنتيجين المطلوب على تحديد عدد وحدات التلازن في معلق الأنتيجين. إذا خفف معلق الأنتيجين بالنقل الثنائي (٠,٥ مل إلى ٠,٥ مل في أنبوبة أو ٥٠ ميكروليتر إلى ٥٠ ميكروليتر في الأطباق الدقيقة) يؤدي إلى تخفيفات ١ : ٢، ١ : ٤، ١ : ٨ ... وهكذا، ويحدث التلازن الكامل عند ١ : ٥١٢ لكن ليس عند ١ : ١٠٢٤، ويحتوي المعلق على مستوى تلازن دم ٥١٢ (تخفيف ١ : ٥١٢ من المعلق يحتوي نظرياً على وحدة تلازن واحدة). هذا يعني أن تخفيف ١ : ٥١٢ من المعلق بها ١٠ وحدات تلازن دم، وتخفيف ١ : ٢٥٦ به ٢ وحدة، وهكذا. وإذا كان المطلوب الحصول على دقة أكثر في تقدير نشاط التلازن لمعلق الأنتيجين، تُستخدم تلقائياً مجموعتان من تخفيفين مضعفين: واحدة تبدأ بتخفيف ١ : ١٠ والثانية تبدأ بتخفيف ١ : ١٥. ينصح دائماً بالمعايرة الراجعة أو العكسية لمعلق الأنتيجين مع معلق خلايا الدم المستعمل في اختبار منع التلازن للتأكد من أن نشاط التلازن قد قيم فعلياً. إذا حسب ٨ وحدات تلازن دم أنه معلق الأنتيجين النهائي الاستخدام فإن التخفيف الثنائي (١ : ٢) سوف يحتوي على ٤ وحدات والذي يليه (١ : ٤) يجب أن يحتوي على ٢ وحدة، والتالي (١ : ٨) يحتوي على وحدة واحدة، والتالي (١ : ١٦) يجب أن يكون سالباً للتلازن.

يوجد اختلافان أساسيان في طرق اختبار التلازن ترجع إلى أنتيجين التلازن. في اختبارات فيروس الإنفلونزا والميكوبلازما والتلازن، تخفيفات السيرم تتم عادة في مخلوط من الأنتيجين والمحلول الملحي (saline). في اختبارات الإنفلونزا التلازن وأنتيجين التلازن يضاف عادة إلى السيرم المخفف في خطوة إضافية. لو استخدمت طريقة إضافة الأنتيجين، فإن الأنتيجين يجب أن يخفف إلى العدد المطلوب من وحدات التلازن في الحجم النهائي من السيرم المخفف مع إضافة الأنتيجين قبل إضافة كرات الدم.

مستوى أنتيجين التلازن المستخدم في الاختبار بدون شك يؤثر على نتائج الاختبار النهائي ولكم اختلافات طفيفة في عدد وحدات التلازن قد تسبب تأثيراً على معيار التلازن في اختبار السيرم. عامة، زيادة مستوى الأنتيجين يؤدي إلى خفض الحساسية وتقليل مستوى الأنتيجين يزيد من الحساسية.

العديد من المتغيرات الأخرى غير تركيز الأنتيجين المستعمل يمكن أن يؤثر على النتائج وتشمل تركيز معلق خلايا الدم الحمراء والوقت بين الخلط للمصل والأنتيجين وإضافة خلايا الدم، درجة الحرارة التى عندها يترك هذا الخليط والمقاييس المستعملة في قراءة الاختبار. Brugh *et al.* (11) قام بدراسة العديد من المتغيرات لفيروس النيوكاسيل وأوصى بزمن قياسي قبل إضافة خلايا الدم. عندما تكون درجة حرارة الاختبار ٣٧ ْم، يجب أن يكون نشاط تلازن الدم للأنتيجين ثابتاً عند تلك الدرجة لأن تغير الأنتجين يمكن أن يزيد من خطأ معيار منع التلازن.

معلق خلايا الدم الحمراء Erythrocyte Suspension

تؤخذ خلايا الدم من دجاجة مفردة إذا أوضحت الخبرة أن المعطى مناسباً، وإلا فإنه يوصى بالجمع من ثلاث دجاجات كحد أدنى (1). يمكن أن يستعمل الدجاج المحصن ضد فيروس النيوكاسيل كمعطى عند الضرورة ويعطى الحرص لطريقة غسيل كرات الدم الحمراء. يستعمل غالباً الرومي كمعطى عند اختبار مصل الرومي لنشاط منع تلازن الدم، ومن ثم تتضاءل التفاعلات غير النوعية. عند اختبار أمصال الرومي، يجب عمل كلٍّ من تلازن الدم ومنع التلازن باستعمال خلايا الدم الحمراء للرومي.

يجب أن يحتوي المحقن المستعمل لسحب الدم على مانع تجلط مثل ٤٪ سترات الصوديوم (١ جزء إلى ٤ أجزاء من الدم) أو محلول ألسيفر (حجم متساوي). بعد خلطه جيداً بلطف ينقل الدم ببطء إلى أنابيب طرد مركزي مخروطية كبيرة للغسل. يضاف حجم مساوي من محلول ملح منظم الفوسفات (رقم حموضة ٧ – ٧,٢) ويطرد الخليط مركزياً عند ٥٠٠ إكس جي لمدة ٥ دقائق. يتخلص من الرائق ويضاف من ٢٠ – ٣٠ حجم من محلول ملح الفوسفات إلى الخلايا المعبأة. يعاد تعليق الخلايا بهدوء وتعاد خطوة الطرد المركزي مرة أخرى وهكذا. عند ذلك يمكن أن تستعمل الخلايا لتحضير معلق ٠,٥٪ اعتماداً على الحجم بإضافة ٠,٥ مل من الخلايا المعبأة إلى ١٠٠ مل من محلول الملح عند رقم حموضة ٧ – ٧,٢. يمكن أن يضبط تركيز خلايا الدم الحمراء باستعمال أنبوبة هوبكنز Hopkins أو مقياس كثافة الضوء.

يمكن أن تخزن الخلايا غير المخففة في حجم كبير من محلول ألسيفر (حوالي ٣٠ مل إلى ٢ مل من الخلايا المعبأة) بخلطها في المحلول وحفظها عند ٤ ْم. يمكن أن تستخدم الخلايا حتى ٦ أيام عند عدم ملاحظة التحلل. يتم إجراء الطرد المركزي للخلايا وتخفف كما وصف عند الحاجة للاختبار.

طرق الاختبار (بيتا وألفا) Test Procedures (β and α)

طرق الاختبار الدقيق تستخدم على نطاق واسع ويوصى بها في اختبارات التلازن. هذه التقنيات مناسبة واقتصادية ومرضية وتقلل ١٠ مرات كمية المواد المستخدمة. وصف طريقة الاختبار الدقيق تم في نسخة سابقة من هذا الكتاب (34).

طريقة بيتا (مصل ـفف-ؤ وس ثابت)

β-Procedure (Diluted–Serum Constant–Virus)

يمكن إجراء اختبار منع التلازن بطريقة بيتا كالتالي :

١) يخفف أنتيجين تلازن الدم في محلول الملح حسب نشاط التلازن ليعطي ١٠ وحدات تلازن دم في ٥٠ ميكروليتر، على سبيل المثال إذا كان معيار الأنتيجين ١ : ٢٥٦٠، ويخفف ١ : ٢٥٦. الأنتيجين المعطل الموصوف بواسطة Beard *et al.* (6) ثابت وآمن لأنه غير معدي.

٢) يوزع الأنتجين-محلول ملح إلى الأطباق باستعمال موزع ١٢ قناة أو ماصة دقيقة متعددة القنوات المزودة بطرق للاستخدام مرة واحدة. أضف ١٠٠ ميكروليتراً إلى الصف الأول و٥٠ ميكروليتراً إلى الصفوف الأخرى. يمكن أن ينجز هذا بسهولة بوضع موزع dispenser لتوزيع الكمية المطلوبة لكل ضربة. الموزعات الآلية أيضاً متوفرة لتوزيع الكواشف ولعمل التخفيفات في الأطباق الدقيقة microplates.

٣) إذا جمعت الأمصال وحفظت في أطباق دقيقة (28)، يمكن أن يلتقط ١٢ مصلاً بسهولة مرة واحدة باستعمال ماصة دقيقة ضرورة ١٢ طرف. تضاف الأمصال (٢٥ ميكروليتراً) إلى الصف الأول من ٩٠ ميكروليتر-حفر وتخلط، مؤدية إلى تخفيف ١ : ٥ من المصل للصف الأول لكل طبق. تخفف الأمصال بحرص كل طبق باستخدام ماصة دقيقة مضبوطة عند ٥٠ ميكروليتراً للخلط في الحفرة والنقل في التخفيفات التسلسلية. هذا يؤدي إلى تخفيفات ١ : ٥، ١ : ١٠، ١ : ٢٠، وهكذا. دائماً يوضع مصل ضابط إيجابي معلوم القيمة في مكان محدد من أطباق تخزين المصل يخدم في الاستدلال على كمية الاختلاف بين الاختبارات. الطريقة البديلة لتخفيف المصل هي إضافة ٥٠ ميكروليتراً من الأنتيجين-محلول الملح إلى كل حفرة. يضاف ٥٠ ميكروليتراً من المصل المراد اختباره إلى الصف الأول مؤدياً إلى تخفيف ١ : ٢. بعد خلط المصل، يمرر ٥٠ ميكروليتراً إلى الصف التالي وهكذا مؤدياً إلى تخفيفات ١ : ٤، ١ : ٨، ... ، وهكذا. العيب الوحيد لهذه الطريقة هي أن التخفيف ١ : ٢٥٦ هو أعلى تخفيف للمصل الذي يمكن اختباره عند وضع ١٢ اختباراً في طبق مفرد. من غير المعتاد الحصول على نتائج منع تلازن غير نوعية عند التخفيفين الأول والثاني في الطريقة البديلة.

٤) تترك الأطباق على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ساعة. بعض المعامل تترك الاختبار عند درجة حرارة الغرفة لمدة ١٠ دقائق، ويمكن تغطية الأطباق لتجنب التبخر بدلاً من وضعها في الكيس البلاستيكي.

٥) بعد ساعة من التحضين يضاف ٥٠ ميكروليتراً من ٠,٥٪ معلق خلايا الدم الحمراء للدجاج لكل حفرة. يساعد التقليب الدائري الهادئ لمعلق الخلايا في الحفاظ على توزيع متساوٍ للخلايا في الحفر.

٦) تترك الأطباق عند درجة حرارة الغرفة حتى يترسب زراراً كامل الاستدارة من الخلايا غير المتلازنة. يحدث عادة ذلك في حوالى ٤٥ دقيقة. هذه الحفر التي تكون سالبة للتلازن تكون بها طبقة منتشرة من خلايا متلازنة تغطي القاع وتساعد مرآة القراءة في قراءة النتائج وتكون ذات فائدة في تسجيل النتائج مباشرة. بعض الباحثين يعتقد في إمالة الأطباق وملاحظة "سقوط الدمع" أو تحرك الأزرار لمشاهدة أن الخلايا غير متلازنة.

٧) تسجل النتائج كمقلوب التخفيف الأعلى للمصل الذي عنده يحدث تثبيط كامل للتلازن الدموي. هذه القيمة (١٦٠ إذا كان ١ : ١٦٠ هو أعلى تخفيف مثبط) لا تضرب بعدد وحدات التلازن المستخدمة في الاختبار. الطريقة المعتادة لقراءة النتائج وحساب متوسط القيم الهندسية قررت بواسطة Brugh (9). في المعامل حيث لا تتوافر أدوات الاختبار الدقيق، يمكن إجراء اختبار بطريقة كافية باستخدام نفس التخفيفات لكن بإحلال ٠,٥ مل بدلاً من ٥٠ ميكروليتراً. تعتبر النتائج بين الطريقتين الدقيقة والكمية ذات قيمة في المقارنة. يمكن أن يحكم بالخطأ على تهرب الأنتيجين من الخلايا المتلازنة كتثبيط تلازن الدم. مشكلة التهرب غالباً عند استخدام فيروسات نيوكاسيل حية أو سريع التهرب كأنتيجين لاختبار التلازن في المعامل التي بها درجات حرارة مرتفعة. يجب ألاّ تستعمل الفيروسات سريعة التهرب كأنتيجين تلازن دم. يمكن تلافي التلوث التصالبي في المعامل متعددة الأغراض بإبطال كل الأنتيجينات الملزنة للدم بإضافة الفورمالين حتى تركيز نهائي ٠,١٪ والتحضين لمدة ٢٤ ساعة عند ٣٧ْ م وهذه تمثل طريقة كافية لفيروس مرض نيوكاسيل.

التعليمات الأخرى لعمل اختبار منع تلازن الدم مع فروق ضئيلة أو كبيرة تتوافر من مصادر أخرى (1, 2, 3, 7, 19). يجب أن يشمل الاختبار أمصالاً ضابطة إيجابية مماثلة ومعروفة المستوى لتسهيل مقارنة النتائج (8). لو تم الحصول على هذه الأمصال الإيجابية من معامل مرجعية، يمكن أن تعمل مقارنة بين المعامل المختلفة في إنجاز الاختبار. المقارنة على مدى واسع في معيار التلازن يمكن الوصول إليه من المعامل المختلفة حتى لو استخدم نفس معلق الأنتيجين والذي يؤكد الحاجة إلى مصل مرجعي له معيار معروف.

طريقة ألفا (مصل ثابت-ڧ وس ڧف)

α-Procedure (Constant–Serum Diluted-Virus)

تحتاج طريقة ألفا لتخفيفات مختلفة من فيروس مرض نيوكاسيل وكمية ثابتة من المصل. يخفف المصل ليختبر حتى ١ : ٥ أو إلى تخفيفات أخرى مناسبة وينقل إلى محلول الملح في اختبار تلازن الدم. تخلط تخفيفات الفيروس والمصل وتحضن عند درجة الغرفة لمدة ١٠ دقائق قبل إضافة خلايا الدم الحمراء. ويكمل الاختبار كما في الطريقة السابقة. يجب أن يجرى اختبار التلازن لمستوى الفيروس فقط ولمستوى المصل مع الفيروس لكي يقارن.

لأن طريقة بيتا تعطي تقييماً أفضل لمستوى منع التلازن للأمصال فإن طريقة ألفا لم تستخدم في معظم المعامل. لوصف أكثر لطريقة ألفا انظر كتاب "الطرق لفحص بيولوجيات الطيور والتعريف وقياس الكم لمرضات الطيور" Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying and Quantifying Avian Pathogens (4).

اختبار تلازن الدم Hemagglutination Test

التطبيق المفيد لهذا الاختبار يكون أثناء عزل فيروس مرض نيوكاسيل والفيروسات الأخرى الملزنة للدم. تؤخذ كمية صغيرة من السوائل السقائية عقب العزل في بيض الأجنة. يمكن أن تجرى هذه الخطوة بعد تبريد البيضة لتقليل فرصة تلوث سوائل البيض بكرات الدم الحمراء أثناء طريقة أخذ العينة من السوائل. توضع كمية ٠,١ مل من السوائل السقائية في طبق المعايرة الدقيقة أو أنبوبة زجاجية. بعد عمل التخفيفات الثنائية في محلول الملح، يضاف ٠,١ مل من ٠,٥٪ معلق خلايا الدم. يمكن عمل نفس الطريقة من السوائل السقائية من البيض الذيى لم يتم حقنه كضابط سالب. هذا السائل يعمل كضابط سالب لا يجب أن يلزن الدم. عند ملاحظة نشاط التلازن مع السوائل من البيض المحقون، يجب عمل اختبارات منع التلازن لمعرفة الأمصال الملزنة وغير الملزنة لمرض نيوكاسيل للدجاج (يفضل من دجاج خالٍ من الممرضات النوعية) لتحديد ما إذا كان فيروس مرض النيوكاسيل هو سبب التلازن. بعد خلط التخفيفات من السوائل السقائية مع الأمصال العادية والمناعية، تضاف كميات متساوية من ٠,٥٪ خلايا دم حمراء. إذا كان الأنتيجين المشتبه هو فيروس نيوكاسيل، سوف يمنع المصل المضاد لفيروس النيوكاسيل التلازن في السوائل المحتوية على فيروس نيوكاسل التلازن. هذه طريقة مرضية وسريعة لحصر الأجنة التي تم حقنها بينما لا تزال قيد الاستخدام المعملي. إذا كان إيجابياً تجمع السوائل الباقية لاختبارات إضافية.

نظراً لوجود ١٥ أنتيجيناً ملزناً للدم على فيروسات إنفلونزا الطيور، فإن هذه الطريقة غير تقليدية لتحديد ما إذا كان التلازن بسبب فيروس الإنفلونزا إلا إذا حدث وباء معروف بنمط فيروس الإنفلونزا المسبب له.

الانتشار المناعي Immunodiffusion

يستخدم كثيراً في طب الطيور لإظهار وتحليل تفاعلات الأجسام المضادة والأنتيجين، حيث يسمح الاختبار بمشاهدة مركب الأنتيجين مع الجسم المضاد كترسيبات عند اختلاط هذين المتفاعلين أثناء الانتشار في الوسط شبه الصلب مثل الآجار. الانتشار المناعي هو تقنية مناعية عالية التخصص وقليلة التكلفة وبسيطة التطبيق. تستخدم عامة في معظم المعامل بطريقة الانتشار المزدوج وفيها ينتشر كلٌّ من الأنتيجين والجسم المضاد تجاه الآخر خلال الآجار على شرائح زجاجية أو أطباق بتري. تسمى عدة مسميات مثل اختبار الترسيب في الآجار واختبار الانتشار المناعي في الآجار واختبار الانتشار المناعي المزدوج واختبار أوشتولوني Ouchtelony test.

يعتمد الاختبار على انتشار الأنتيجين والأجسام المضادة من حفرتها خلال الآجار شبه الصلب. عند وصول التركيز النسبي المناسب لكل كاشف يتكون ترسيب محدثاً خطاً أو خطوطاً اعتماداً على عدد اتحادات الأنتيجين والجسم المضاد الذي يحتوي على التركيزات النسبية المطلوبة لتكوين ترسيب مرئي.

وصف الاختبار لأمراض الدواجن المختلفة شاملة مرض مارك (29)، ومرض البيرسا المعدي (16)، والالتهاب الشعبي المعدي (36 ,37)، والتهاب المفصل الفيروسي (23)، والارتعاش الوبائي (AE) (20)، وإنفلونزا الطيور (5)، ومرض نيوكاسيل (14)، وجدري الطيور (17)، والإصابة بالميكوبلازما (22)، وأخرى (21). يتطلب كل تطبيق عملي تقنيات مناسبة لتحضير الأنتيجين واختبار المحاليل المنظمة وتكوين الهلام. لذلك يجب أولاً الإحاطة بأساسيات التفاعل والطريقة العامة كما وصفت في كتب مختلفة (13 ,18 ,32).

ميزات مثل هذا الاختبار متعددة. باستخدام الكواشف المرجعية المعروفة يستطيع الباحثون في المعمل التعرف على إما العامل المعدي أو الأجسام المضادة. رؤية خطوط الترسيب التي تلتحم مع خطوط التعرف من التفاعلات المعروفة هو طريقة تشخيصية مؤكدة تحتاج لتكلفة وجهد قليل.

تستخدم عدة طرق لوضع الهلام وتُستخدم غالباً أطباق بتري البلاستيكية أو الزجاجية. تقطع أسطوانات من الهلام بالقاطعة المصنعة أو التجارية وتزال لتحدث حفر العينة (24). الشكل المعتاد هو ستة حفر حول حفرة مركزية. الحفر تكون تقريباً ٥,٣ ملم في القطر وتسع حوالى ٢,٤ ملم. ينتج السمك الصحيح للاجار (٢,٨ ملم) تقريباً بوضع ١٥ — ١٧ مل من الآجار في طبق بتري سعة ١٠٠ ملم أو ٦ مل في طبق سعة ٦٠ ملم. تشفط سدادة الآجار بماصة صغيرة متصلة بقارورة الشفط. أحياناً يقفل قاع الحفرة بنقطة صغيرة من الوسط الذائب لمنع الكواشف من التسرب تحت الهلام بدلاً من الانتشار خلاله. بعض العاملين يستخدم الأطباق البلاستيكية المتوافرة تجارياً للاختبار (معامل ألفا جاما، كاليفورنيا) (Alpha Gamma Laboratories, Inc., Sierra Madre, Calif.). إذا كانت الأطباق المحتوية على وسط الانتشار غير محكم الغلق، يجب أن توضع في غرفة رطبة مثل الكيس البلاستيك الذي يحتوي على فوطة ورقية لتجنب جفاف الآجار. يمكن أن تجهز بيئة الانتشار على شريحة المجهر الزجاجية التي لها أطرف مجمدة.

إذا قطع نمط ثابت من الحفر إلى الوسط، يمكن أن تعلم الحفر عند نهاية الشريحة المتجمدة للهبوط. الشرائح يمكن أن توضع في غرفة عند رطوبة في صينية صبغ الشرائح بشكل عمودي بحيث تكون الشرائح أفقية. يمكن أن توضع الشريحة في غرفة رطبة، إناء مغلق يؤمن عدم جفاف الهلام. إذا كانت الحرارة في المعمل أقل من ٢١°م فيجب وضع الأطباق أو الشرائح في حضان ٢٦°م.

يوضع كل مصل مشكوك فيه أو أنتيجين جوار الكاشف الإيجابي المعلوم. هذا يجعل ملاحظة خط التشابه المستمر ممكنة وتظهر التفاعلات الإيجابية الضعيفة بواسطة الإنحناء الخفيف لطرف خط الترسيب قرب الحفرة المشكوك فيها.

يحضر وسط شبه صلب شائع الاستعمال للانتشار المناعي مع ٠,٧٪ - ١٪ آجار نقي أو منقى جزئياً و٨٪ كلوريد الصوديوم. هذه النقاوة تمثل اعتبار مهم لأنها يمكن أن تؤثر على الانتشار الحر للمتفاعلات. بعض أنواع الآجار المستخدم للزرع البكتيري له مجاميع كيميائية مشحونة بقوة تستطيع الالتحام مع أنتيجينات معينة، التي تتداخل مع تكوين شريط ترسيب ظاهر. الآجاروز في تركيز ٠,٩٪ أيضاً يكون مناسباً كوسط انتشار.

العامل المهم الأخير هو تركيز المتفاعل. يتحدد موضع خط الترسيب بين الأنتيجين والجسم المضاد بالتركيزات النسبية ومعدلات الانتشار للمتفاعلات. للأغراض العملية، لا يمكن تناول معدلات الانتشار على الرغم أن تركيز المتفاعل يجب أن يضبط أحياناً قبل أن تصبح خطوط الترسيب ظاهرة. السبب في هذا أنه في حالة زيادة أحد المتفاعلات عن الآخر، قد يحدث تفاعل الترسيب داخل الحفرة التي بها تركيز أقل والتي تعطي نتائج سلبية ظاهرة. بالإضافة لاكتشاف الأجسام المضادة في المصل، يمكن أن يستخدم اختبار الانتشار المناعي لاكتشاف الأجسام المضادة في المح. يخفف المح مع أجزاء متساوية من محلول الملح الفسيولوجي أو يرج أو يخلط على خلاط هزاز لمدة ٣٠ – ٤٠ ثانية، ويعاد طرده مركزياً عند ١٠٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة. يستخدم الرائق الشفاف الأصفر في الاختبار.

يمكن قراءة نتائج اختبار الانتشار المناعي بعد عدة ساعات أو أيام عديدة، اعتماداً على تركيزات الأنتيجين والجسم المضاد. أفضل ما تشاهد خطوط الترسيب يكون على خلفية داكنة مع إضاءة الهلام بميل من القاع. مصادر الإضاءة عادة تصنع يدوياً (15) لكنها أيضاً متوفرة تجارياً. نموذج ٦٢٣ المجهر المضيء (American Optical, Leica, Inc. Deerfield, Ill.) يفي جداً بهذا الغرض.

تسجل النتيجة إيجابية نوعية عندما يكون الخط المرسب بين حفرتي الضابط الإيجابي المعلوم متصلاً مع الخط بين الأنتيجين وحفرة الاختبار. من الضروري أن كل حفرة اختبار توضع مجاورة لحفرة الضابط الموجب. تلاحظ تفاعلات خفيفة عندما ينحني خط الترسيب عند نهاية حفرة الاختبار ويلاحظ التشابه الجزئي. يكون تداخل الخطوط المتقاطعة كمصل اختبار غير متشابه مع الأجسام المضادة في حفرة الضابط الموجب. توفر طريقة الانتشار المناعي عدة مميزات، لكنها تفتقر إلى مستوى الحساسية المتوافر باختبارات أخرى متعددة وإذا لم يستخدم اختبار الانتشار المناعي القطري، تفتقر الطريقة إلى القدرة على تحديد مستويات الجسم المضاد.

اختبار تعادل الفـ وس Virus-Neutralization Test (VN)

هي اختبارات مصلية تستخدم تعادل الفيروس للقياس الكمي للجسم المضاد وتستخدم غالباً في معامل التشخيص والبحوث. تستخدم مع مضادات الأمصال المعلومة وتكون مفيدة جداً في تعريف الفيروسات المجهولة والتفريق بين الفيروسات. الاختبار له جزئين، في جزء التعادل، تخلط الفيروسات (عند التخفيف الصحيح) مع

المصل (أيضاً عند التخفيف الصحيح) في أنبوبة اختبار. يخلط الفيروس مع المصل ويحضنان معاً على درجة حرارة قياسية حسب الزمن المحدد. في الجزء الثاني، يقيم الفيروس المتبقي غير المتعادل في نظام استدلال مناسب (انظر الفصل الخامس والأربعون على معايرة المعلقات البيولوجية). تكون الطريقة العامة للاختبار كالتالي (التحويرات تعطى عند الضرورة لأنظمة العائل المختلفة).

الأمصال Sera

يجب أن تكون معقمة (قد ترشح بالمرشح الغشائي) وخالية من أي حوافظ كيميائية (فينول، وفورمالين، وهكذا)، وتسخن عند ٥٦°م لمدة ٣٠ دقيقة لتكسير المواد غير النوعية المثبطة للفيروس التي تتأثر بالحرارة. لكي تستخدم مضادات الأمصال كقياسية أو لتعريف الفيروسات المجهولة يجب أن تنتج في دجاج خالٍ من الممرضات النوعية من مزرعة فيروس منتقاة بطريقة البقع. يجب أن تحفظ أمصال طبيعية من طيور خالية من الممرضات النوعية لتكون متوفرة كمصل ضابط أثناء طرق الاختبار.

الف وس Virus

يجب أن تكون عترات الفيروس المستخدمة لاختبارات التعادل عالية التركيز، ولا تحتوي على تجمعات الفيروس وتكون متأقلمة لنظام العائل المستخدم. يجب أن تكون عترات الفيروس في مزارع نقية ويفضل أن تنقى بالاستنساخ وخالية من البكتيريا والفطريات أو الميكوبلازما. يفضل حفظ كميات الفيروسات في عبوات بغطاء قلاووظ أو عبوات بلاستيكية تجميدية تخزن عند −٦٠°م أو أقل.

ا خففات Diluents

المخفف المستخدم يمكن أن يكون وسط مزرعة الخلية أو مخففات أخرى معروفة متوافقة مع كلٍّ من الفيروس ونظام العائل المستخدم.

طريقة تعادل بيتا (β) (ف وس ثابت-مصل ففف)

β-Neutralization Procedure (Constant-Virus Diluted-Serum)

في هذه الطريقة، تختبر التخفيفات المتسلسلة للمصل ضد جرعة قياسية من الفيروس، ولهذه التقنية مميزات محددة في أنها تستخدم كميات صغيرة من المصل، ويفضل الاختبار للفيروسات قليلة التركيز، وأكثر فائدة لإظهار الفروق المعنوية في الأجسام المضادة المعادلة بين عينات المصل من الحالات الحادة والناقهة المأخوذة من قطعان مشتبه فيها.

الاستجابة الكمية في مزرعة خلية تنمو في أطباق فردية ٣٠ مل أو أطباق تحتوي حتى ٩٦ حفرة مزرعة تختار كنظام استدلالي في المثال التالي. يمكن أن يستخدم نظام مزرعة الخلية ٩٦ حفرة بنفس نظام التوزيع المستخدم في اختبارات منع تلازن الدم. على الرغم أن الأساسيات هي ذاتها لكل الأنظمة، إلا أن أحجام الكاشف تختلف بين الأنظمة والطرق.

١) في جزء التعادل من الاختبار تجرى تخفيفات مصل متسلسة ثنائية أو رباعية في وسط مزرعة الخلية في أطباق اختبار دقيقة أو في سلسلة من الأنابيب.

٢) يخفف الفيروس في نفس الوسط ليحتوي على جرعة معدية متوسطة ($TCID_{50}$) في ٠,١ مل (١٠٠ $TCID_{50}$ هو المستخدم غالباً). يحدد تخفيف الفيروس من المعايرة السابقة للفيروس بنفس الطريقة (الاستجابة الكمية في مزرعة الخلية) وتجهز كمية مناسبة وتترك في حمام ثلج بكمية كافية لكل تخفيف من المصل وللضوابط ولبعض المزيد. إنه من المعتاد المعايرة الراجعة أو العكسية للفيروس مع كل اختبار تعادل للتأكد أن ١٠٠ جرعة متوسطة قد استخدمت (انظر الفصل الخامس والأربعون).

٣) في سلسلة من الأنابيب أو في طبق اختبار دقيق، اخلط جيداً أحجاماً متساوية من كل من تخفيفات المصل مع تخفيف الفيروس المحتوي على ١٠٠ $TCID_{50}$ في ٠,١ مل. للفيروس الضابط، يخلط تخفيف الفيروس مع مصل طبيعي معلوم أو محلول ملح فسيولوجي. يجب أن يكون هناك خليط كافٍ لحقن تكرار مزارع الخلية ولبعض المتبقي الزائد، على سبيل المثال لخمس مزارع وحيدة الطبقة يستقبل كل منها ٠,٢ مل، حضر ١,٥ مل أو ٢ مل من الخليط. يمكن أن يتم المسح الأولي للأجسام المضادة بعمل تخفيفات مفردة للأمصال في أنابيب منفصلة وتنقل الأمصال المخففة إلى الطبق. عندما تعمل التخفيفات لتحديد مستويات الجسم المضاد، يمكن أن تعمل أيضاً في طبق معايرة دقيق، وكن حريصاً حتى لا تخدش الحفر. يضاف الفيروس عندئذ ويحضن ويضاف عند ذلك معلق مزرعة الخلية.

٤) حضن مجموعة الأنابيب وأنبوبة ضابط الفيروس لمدة ساعة عند ٢٥ْ م، إذا لم يحدد وقت آخر أو درجة حرارة معينة.

٥) لقياس الفيروس المتبقي، احقن ٠,٢ مل من كل خليط المصل والفيروس إلى كل خمسة مزارع وحيدة الطبقة تحتوي على وسط حديث وحضنها عند ٣٧ْ م. استخدم ماصات منفصلة لكل تخفيف أو احقن أولاً تخفيف المصل الأقل. في طريقة بيتا، هذا يكون ضرورياً لأن الفيروس النشط يكون في التركيز الأعلى عند أعلى تخفيف للمصل وقد يحمل بعد ذلك إلى التخفيف التالي الأقل للمصل في الماصة.

٦) افحص المزارع عند الزمن المناسب للفيروس المختبر وسجل التأثير المرضي الخلوي في المزرعة كموجب أو سالب. عندما يبنى النظام الكاشف على الاستجابة العددية في مزرعة الخلية أو الاستجابة الكمية في أجنة

الدجاج، فإن اختبارات التعادل (خطوات ١ — ٤) تكون متشابهة. يختلف قياس الفيروس المتبقي مع النظام والاستجابة لكنها سوف تكون مشابهة لتلك المستخدمة لتحديد مستوى الفيروس (انظر الفصل الخامس والأربعون عن معايرة المعلقات البيولوجية).

حساب ا عيار ا تعادل لطريقة بيتا

Calculating of Neutralizing Titer for β Method

عندما يقاس الفيروس المتبقي بالاستجابة الكمية، يحسب ٥٠٪ من نقطة نهاية التعادل بطريقة ريد ومونش (25) (الجدول رقم ٤٦،١) أو سبيرمان-كاربر (12) كما وُضح في الفصل الخامس والأربعون. يحسب المستوى المتعادل أو متوسط جرعة الحماية (PD_{50}) من نقطة النهاية هذه.

للاستجابة العددية، نقطة النهاية هي تخفيف المصل الذي يعادل ٥٠٪ (٨٠٪ أو ٩٠٪ في بعض الأنظمة) للفيروس. يمكن أن تقحم نقطة النهاية بنفس الطريقة التي تكافئ المسافة الناتجة. يمكن أيضاً أن يتم الإقحام كتابياً أو بطرق إحصائية أخرى.

ا دول رقم (٤٦,١). البيانات ساب نقطة اية التعادل ٥٠٪ لاختبار تعادل الف وس بطريقة ريد، مونش (25).

فيف ا صل		نسبة	الاستجابة		القيم التراكمية		نسبة ا صاب/	نسبة
الرقمي	لوغاريتم	الإصابة[A]	ا صابة	غ ا صابة	ا صابة ↑	غ ا صابة ↓	الكلي	ا صاب
١ : ٤	$١٠^{-٠,٦}$	٥/٥	٥	صفر	١١	صفر	١١/١١	١٠٠
١ : ١٦	$١٠^{-١,٢}$	٥/٤	٤	١	٦	١	٧/٦	٨٦
١ : ٦٤	$١٠^{-١,٨}$	٥/٢	٢	٣	٢	٤	٦/٢	٣٣
١ : ٢٥٦	$١٠^{-٢,٤}$	صفر/٥	صفر	٥	صفر	٩	صفر/٩	صفر

[A] العدد المصاب/العدد المحقون (رقم تجريبي).

طريقة تعادل ألفا α (مصل ثابت-ف وس فف)

α-Neutralization Procedure (Constant-Serum Diluted-Virus)

في هذه الطريقة، تخلط تخفيفات متسلسلة للفيروس مع التخفيف القياسي للمصل (نمطياً، يستخدم المصل غير المخفف). يحضن خليط المصل والفيروس ويقاس الفيروس المتبقي كما سبق في أي عائل، عادة بواسطة الاستجابة الكمية.

تختار الاستجابة الكمية في أجنة الدجاج كنظام استكشافي في المثال التالي.

١) لجزء التعادل، جهز تخفيفات عشرية للفيروس ورتبها في حامل كما هو موضح في الجدول رقم (٤٦،٢) صف ١.

٢) حضر صفوف أنابيب اختبار معقمة صغيرة للأمصال الضابطة السالبة (صف ٢) والإيجابية (صف ٣) وصف لكل مصل مجهول (صفوف ٤ و ٥).

٣) أضف ٠،٤ مل إلى كل الأنابيب في صف ٢ وأضف ٠،٤ مل من مصل معقم معروف أنه خالٍ من الأجسام المضادة ضد العامل المراد دراسته. في غياب مثل هذا المصل، يمكن استخدام مخفف معقم. هذا الصف سوف يخدم كمصل سالب أو فيروس ضابط. أضف إلى كل الأنابيب في صف ٣ كمية ٠،٤ مل من مصل معقم معروف احتوائه على أجسام مضادة للعامل المراد دراسته. سوف يخدم هذا الصف كضابط إيجابي. أضف لكل الأنابيب في الصفوف الأخرى ٠،٤ مللي من المصل المراد اختباره.

٤) انقل ٠،٤ مل من تخفيف الفيروس من صف ١ أنبوبة ٨ إلى الأنبوبة الثامنة في صفوف ٢ و ٣ و ٤ و ٥ واستبعد أي فيروس باقي في الماصة. بنفس الماصة انقل ٠،٤ مل من تخفيف الفيروس من الصف ١ وأنبوبة ٧ إلى الأنبوبة السابعة في الصفوف الأخرى. استمر حتى تحتوي كل الأنابيب على الفيروس. عند معرفة مستوى الفيروس، ثلاثة إلى خمس تخفيفات في المجموعة الضابطة عادة تفي بالغرض لتحديد نقطة النهاية في الاختبارات التالية. غالباً، يجب أن يختبر المصل المجهول مع مدى واسع من تخفيفات الفيروس لتأكيد اكتشاف نقطة النهاية.

٥) اخلط الفيروس والمصل جيداً بهز كل أنبوبة فردياً أو بهز حامل الأنابيب بشدة. اترك الخليط عند ٢٥°م لمدة ساعة إذا لم يحدد وقت آخر.

٦) لمعايرة الفيروس المتبقي، ابدأ حقن أدنى تخفيف للفيروس في مجموعة المصل المجهول واحقن كل ٥ بيضات أجنة على الأقل بكمية ٠،١ مل بالطريقة الأمثل. استكمل إلى التخفيف التالي مستخدماً نفس الإبرة والمحقن. كرر هذا حتى يتم حقن كل خليط الفيروس والمصل. في حالة اختبار أكثر من مصل، استعمل إبراً ومحاقن منفصلة لكل مصل، واحقن كل هذه المخاليط كالسابق. يجب أن يحقن خليط الفيروس الضابط مؤخراً باستعمال إبرة ومحقن منفصلين. للعمل الحرج جداً استعمل محقن وإبرة منفصلين لكل مخلوط مصل وفيروس.

٧) اقفل البيض بالوسيلة المناسبة وأعده إلى الحضان للوقت المحدد للفيروس المستخدم. افحص البيض بعد ١٨ — ٢٤ ساعة واستبعد كل البيض المحتوي على أجنة نافقة. افحص البيض يومياً والأجنة النافقة لوجود الآفات عند اللزوم. عند نهاية زمن التجربة، يمكن أن يفحص البيض الحي المتبقي للآفات عند اللزوم وسجل النتائج.

ا دول رقم (٤٦,٢). طريقة الاختبار باستخدام مصل ثابت-ﭬ وس ف (ألفا).

رقم الصنف	ا توبات	رقم الأنبوبة ١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨
١	تخفيف للفيروس	$١٠^{-١}$	$١٠^{-٢}$	$١٠^{-٣}$	$١٠^{-٤}$	$١٠^{-٥}$	$١٠^{-٦}$	$١٠^{-٧}$	$١٠^{-٨}$
	الكمية (مل)	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠
٢	مصل سالب (مل)	٠,٤[A]	٠,٤[A]	٠,٤[A]	٠,٤[A]	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤
٣	مصل موجب (مل)	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤[B]	٠,٤[B]	٠,٤[B]	٠,٤[B]
٤	مصل مجهول (مل)[C]	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤
٥	مصل مجهول[C]								

[A] افتراض الفيروس له نقطة نهاية $١٠^{-٦}$ أو $١٠^{-٧}$، هذه يمكن أن تحذف للمحافظة على المصل والجنين.

[B] افتراض المصل يعادل ٤ لوغاريتم من الفيروس والفيروس له نقطة نهاية $١٠^{-٦}$ أو $١٠^{-٧}$ هذه يمكن أن تحذف لحفظ المصل والأجنة.

[C] مثال للمصل المجهول قد يكون حاداً أو مصل نقاهة.

يمكن حساب PD_{50} من المثال المعطى في الجدول رقم (٤٦,١) بالمعادلة التالية :

$$\text{المسافة المتناسبة} = \frac{\text{النسبة المصابة عند التخفيف التالي أكثر من ٥٠٪} - ٥٠٪}{\text{النسبة المصابة عند التخفيف التالي أكثر من ٥٠٪} - \text{النسبة المصابة عند التخفيف التالي أقل من ٥٠٪}}$$

$$= \frac{٨٦ - ٥٠}{٨٦ - ٣٣} = \frac{٣٦}{٥٣} = ٠,٦٧$$

احسب لوغاريتم١٠ لنقطة نهاية التعادل لـ ٥٠٪ أو المسافة المكافئة ٥٠٪ : مقلوب ٥٠٪ نقطة نهاية التعادل = المسافة المكافئة x لوغاريتم معامل التخفيف للمصل + لوغاريتم التخفيف الأقل المستخدم لحساب المسافة المكافئة

= (٠,٦٧ x ٠,٦) = (١,٢)

= ٠,٤ + ١,٢ = ١,٦

= ٤٠ (مضاد لوغاريتم $١٠^{١,٦}$)

٥٠٪ نقطة نهاية التعادل ٥٠٪ أو المسافة المكافئة ٥٠٪ = ١ : ٤٠

حساب معامل التعادل لطريقة ألفا

Calculating of Neutralizing Titer for α Method

عند قياس الفيروس المتبقي بالاستجابة الكمية، يمكن حساب نقطة النهاية لكل مصل بطريقة ريد ومونش أو سبيرمان-كاربر. توضح نتائج الاختبار الفرضي في الجدول رقم (٤٦،٣). معمل التعادل (NI) للمصل هو الفرق بين لوغاريتم المعيار للفيروس الضابط (مصل سالب) ولوغاريتم١٠ لمخلوط المصل والفيروس. ليس له وحدات. لذلك في المثال الموضح في الجدول رقم (٤٦،٣):

معيار الفيروس الضابط (أو المصل السالب - خليط الفيروس) = ٦,٥ ،

معيار المصل الموجب - خليط الفيروس = ٢,٥ والفرق (معامل التعادل) = ٤,٠.

ا دول رقم (٤٦,٣). مثال نتائج تعادل للف وس[A].

ا صل	فيف للف وس (لو.١٠)[B]								لو.١٠ ID_{50}[C]	معامل التعادل (NI)
	-١	-٢	-٣	-٤	-٥	-٦	-٧	-٨		
مصل سالب (فيروس ضابط)					٥/٥[٢]	٥/٤	٥/١	٥/٠	٦,٥[C]	
مصل موجب	٥/٥	٥/٥	٥/٠						٢,٥	٤,٠
مصل مجهول			٥/٥	٥/٣	٥/٠	٥/٠			٤,٢	٢,٣
مصل مجهول			٥/٢	٥/٠	٥/٠	٥/٠			٢,٨>	٣,٧<
مصل مجهول			٥/٥	٥/٥	٥/٥	٥/٤			٦,٠<	٠,٥>

[A] اختصارات: ID_{50} = متوسط الجرعة المعدية، NI = معامل التعادل.

[B] القيم في الجدول هي العدد الميت/العدد المحقون.

[C] المستوى محسوب بطريقة ريد ومونش.

يعبر عن معامل التعادل حسابياً أحياناً (مثل في المثال السابق ١٠٠٠٠)، في هذا المثال يمثل معامل التعادل نسبة معيار نقطة النهاية الحسابية للفيروس الضابط والمصل الإيجابي-فيروس ضابط. من المهم جداً التفريق بين اللوغاريتم والأشكال الحسابية خاصة عندما يكون معامل التعادل منخفضاً.

من الشائع في المعامل استقبال عينات أمصال مجمعة لتقييم مضادات الأجسام التي تتكون من أجزاء متساوية من الأمصال من العديد من الدجاج. هذه العينات المجمعة تعطي نتائج غير حقيقية عن حالة المضاد الحيوي. في المثال السابق حيث كان معامل التعادل ٤ بافتراض أن العينة المجمعة من ١٠ دجاجات، من الممكن أن ٩ من ١٠ دجاجات ليس لها معيار مضاد حيوي، بينما ١ من ١٠ له معامل تعادل ٥. نتيجة التجمع ممكن أن تؤدي إلى معامل تعادل ٤ تقريباً. المعلومات المحدودة من العينات المجمعة يجب أن تُقيم مع الاختبار المعملي لكل مصل على حدة.

التلازن Agglutination

تجمع أو تلازن البكتيريا بالأجسام المضادة النوعية في الدم الكامل وفي المصل هو أحد أول الطرق المصلية التي استخدمت كثيراً في السيطرة على أمراض الدواجن.

تعتمد اختبارات التلازن على الأمراض مثل الزكام المعدي والإصابة بالسالمونيلا (شاملة بللورم وتيفويد الدواجن) والإصابة بالميكوبلازما. قد يجرى الاختبار على شريحة زجاجية أو أطباق بورسللين (اختبار المصل على الشريحة) وفي أنابيب اختبار (اختبار الأنبوبة) أو في حفر أطباق الاختبار الدقيق. ارجع إلى الفصل الخاص بالأمراض البكتيرية في هذا الكتاب لتفاصيل الطرق والأنتيجين المستخدم للاختبارات النوعية لمرض معين.

اختبار الشريحة يستخدم كثيراً كاختبار مسح أولي. إذا لزن المصل الأنتيجين الملون في اختبار الطبق ، يخفف المصل تسلسلياً بعد ذلك ويختبر عند تركيزات متناقصة لقدرته على تلازن الأنتيجين في الأنابيب أو في الحفر الخاصة بأطباق الاختبار الدقيق. يعرف مستوى التلازن كمقلوب أعلى تخفيف للمصل الذي يحدث عنده تلازن كامل. للعدد الصغير من عينات المصل ، أحياناً تخفف العينات وتختبر فقط بطريقة الشريحة. إن تطبيق طريقة الاختبار الدقيق لاختبار التلازن للسالمونيلا (35) وللميكوبلازما قللت بشدة التكاليف والوقت المرتبط مع اختبار التلازن.

الإليزا Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

أصبحت الإليزا الاختبار المصلي الأساسي المستخدم بواسطة معظم المعامل للاختبار المصلي. يعتمد على طريقة تحديد معيار الجسم المضاد لعينة منفردة Snyder and Marquardt (26, 27, 28). تسمح هذه الطريقة بتطوير أشكال القطيع إما من خلال إدماء مفرد أو اعتماداً على جمع العينات طوال الوقت. تطبيق الكمبيوتر الدقيق للتحكم في قارئ الطبق وإعداد البيانات يبسط معاملة المعلومات. تتوفر تجارياً الأطقم الجاهزة للاستعمال لمعظم ممرضات الطيور البكتيرية والفيروسية. تشمل هذه الفيروسات (لكنها غير محددة) نيوكاسيل والالتهاب الشعبي وجمبورو وريو وميكوبلازما جاليسيبتكم وميكوبلازما سينوفي وباستيريللا ملتوسيدا وفيروس التهاب المخ الطيري وأنتيجين والجسم المضاد الفيروسي لمرض ليكوسيس الليمفاوي وفيروس إنفلونزا الطيور وفيروس أنيميا الدجاج وفيروس الالتهاب المعوي النزفي وميكروب بوردتيللا الطيور وسالمونيلا إنترتيدس.

حساب ا عيار Titer Calculation

يمكن أن يقوم ببساطة على قيمة الامتصاص المصححة حيث يطرح متوسط الضابط السالب من امتصاص عينة الاختبار. الطريقة الثانية هي أخذ الحسابات كخطوة إضافية في حساب نسبة العينة – الموجب (S/P). امتصاص

العينة ومتوسط امتصاص الضابط الموجب يصحح كلاً منهما للخلفية بطرح متوسط امتصاص الضابط السالب من كلٍّ منهما، ومن ثم:

$$\text{S/P} = \frac{\text{امتصاص العينة – متوسط امتصاص المصل الضابط السالب}}{\text{متوسط امتصاص المصل الضابط الإيجابي - متوسط امتصاص المصل الضابط السالب}}$$

$$S/P = \frac{\text{Sample absorbance} - \text{NC}\ \overline{x}}{\text{PC}\ \overline{x} - \text{NC}\ \overline{x}}$$

حيث

$\text{NC}\ \overline{x}$ = متوسط امتصاص المصل الضابط السالب

$\text{PC}\ \overline{x}$ = متوسط امتصاص المصل الضابط الموجب

أنظمة إليزا التجارية للفحص المصلي للدواجن نمطياً تأخذ حسابات المستوى إلى خطوة تالية باستعمال طريقة الانحدار المزدوج. الخطوة الثانية والنهائية في هذه الطريقة تكون بتطبيق معادلة الانحدار الخطية لحساب مستوى الإليزا باستخدام طريقة العينة المفردة علاوة على حساب المستوى معتمداً على التخفيف المتسلسل. تعرف معادلة الانحدار الخطي العلاقة بين لو.$_{١}$ لنسبة S/P لتخفيف المصل المفرد ولو.$_{١}$ لمستويات الجسم المضاد الملحوظة. يؤخذ هذا نمطياً:

مستوى لو.$_{١}$ = الانحدار x [لو.$_{١}$ (S/P)] + *y* intercept

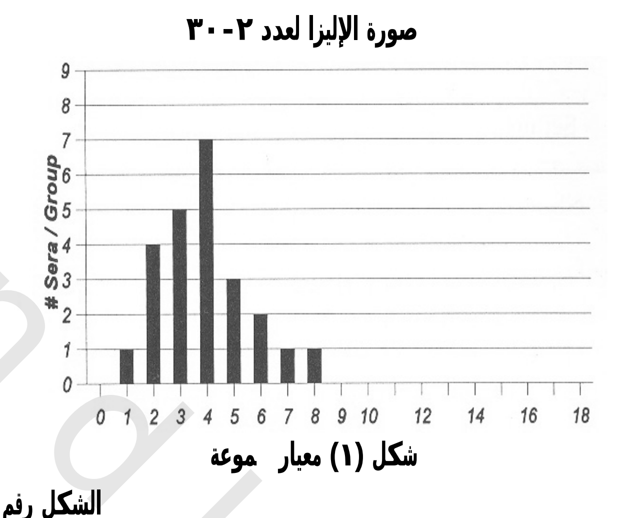
المستوى = عكس لوغاريتم (الانحدار x [لو.$_{١}$ (S/P)] + *y* intercept).

نسبة تكون S/P مركزية لهذا الحساب. القيم الفعلية المستخدمة للانحدار و *y* intercept هي قيمة متفردة للنظام المتخصص.

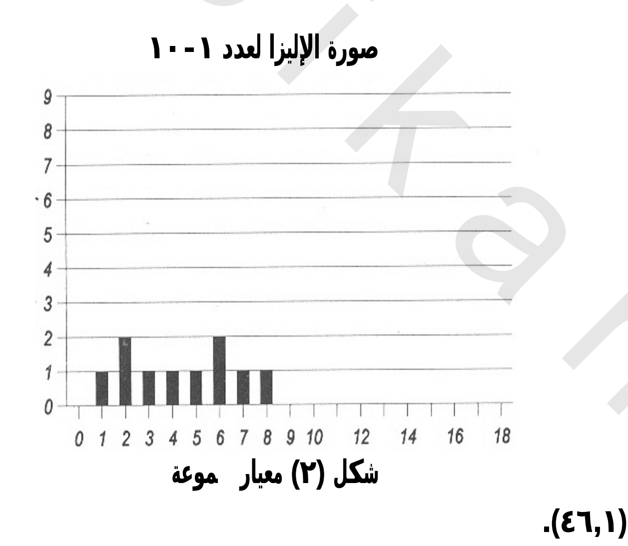
بمجرد حساب المستويات لعينات المصل المنفرد، توضع المستويات في مجموعتها تبعاً للمستويات المعينة، التي هي مستوى مجموعة صفر يمكن أن تكون كل المستويات بين صفر و١٥٠٠، وسوف يكون مستوى مجموعة ١ كل المستويات أو القيم بين ١٥٠١ و ٢٠٠٠ وهكذا. ينتج الرسم البياني اعتماداً على عدد الأمصال في كل مجموعة. يستعمل الرسم البياني لمشاهدة توزيع المستويات داخل مجموعة الأمصال المختبرة.

حجم العينة Sample Size

يزداد حجم العينة المطلوب لتمثيل الحالة المصلية لقطيع مع حجم القطيع ، إلا أن نقطة الفائدة المتضائلة لهذه الطريقة توجد عند اختبار قطعان التسمين. يجب أن يكون الحد الأدنى ٢٠ عينة لكل قطيع مختبر. يقترح ٣٠ عينة مصل لكل قطيع من قطعان الأمهات والبياض. حجم العينات أقل من ١٠ يكون غير مناسب لأن الرسم البياني سوف يفتقر لنقاط البيانات الضرورية للتمثيل والتقييم الحدي. يوضح هذا في الشكل رقم (٤٦,١). يمثل الشكل (١) مجموعة مختارة من ١٠ أمصال من مجموعة من ٣٠ مصل في الشكل (٢). صفات الشكل (١) تكون مختلفة جداً من تلك في الشكل (٢) حتى بالرغم من أن الأمصال من نفس القطيع.



شكل (١) معيار موعة



شكل (٢) معيار موعة

الشكل رقم (٤٦,١).

مصادر القلق Troubleshooting

عملية ا ص Pipetting

الإليزا اختبار حساس جداً وقابل لأخطاء المص. يكون أكبر الأخطاء الشائعة في المص نتيجة للامتلاء غير الصحيح بسبب عدم تثبيت أطراف الماصة. هذا يكون حقيقياً عند استخدام الماصات عديدة القنوات. إن ممارسة تحميل هذه الأطراف مباشرة من حامل الأطراف بدون التأكد من تثبيتها يمكن أن يسبب أخطاء مص حجمية ظاهرة. إضافة إلى ذلك يجب أن تضبط الماصات بصفة دورية للسحب الأمثل.

غسيل الطبق Plate Washing

غسيل الطبق غير الجيد يمكن أن يسبب اختلافاً يمكن أن يكون صعب الحكم عليه. تلوث الجزء الأعلى للأطباق التي قد لا تغسل بكفاءة يمكن أيضاً أن يؤدي إلى تفاوت في الاختبار. الانتباه بحرص للإضافة الأمثل وشفط أو سحب خامات الغسيل يكون أساسياً لثبات النتائج. افحص الماصات وجهاز غسل الأطباق الأوتوماتيكي بصفة

متكررة للحجم الأمثل ومعدل السحب والسحب الجيد للكواشف ومحاليل الغسيل. قلب الأطباق على نسيج ماص بعد كل خطوة غسيل يجرى بواسطة العديد من المعامل كوسائل إزالة أي محلول غسيل زائد. يوصى بعمل ٤ — ٥ مرات غسيل بعد كل سحب لكل كاشف. يوصى بعض المنتجين بخطوات نقع كجزء من طريقة الغسيل. يساعد هذا على إزالة الكواشف التي قد لا تغسل جيداً من النظام باستخدام مرات غسيل متتالية سريعة. يجب دائماً اتباع تعليمات وتوصيات المصنعين.

الفقاقيع وتلوث سطح الطبق Bubbles and Plate Surface Contamination

يمكن أن تسبب العملية أحياناً فقاقيع صغيرة يمكن أن تهمل بسهولة. كن متأكداً لفحص الحفر لوجود الفقاقيع وإزالتها قبل قراءة الأطباق. جفف قاع الطبق مع نسيج نظيف قبل القراءة. أي رطوبة أو تلوث لقاع الحفر سوف يؤثر على قيم الامتصاص.

الأطقم التجارية ومراقبة ا ودة Commercial Kit Reagent and Quality Control

يجب أن تحفظ عند ٤ °م أو حسب توصية المصنع. اترك دائماً الكواشف لتدفأ في درجة حرارة الغرفة قبل الاستخدام. لغرض مراقبة الجودة حافظ على سجلات أرقام حصة الطقم وقيم الضابط السالب والموجب. لكل نوع اختبار. بالإضافة يجب تطوير ضوابط موجبة في المعمل وتستعمل لتعطي قياساً آخر لضبط الجودة. إنه من الجيد أيضاً لمراقبة الجودة إرسال مجموعة من أمصال سابقة المعايرة خلال المعمل لرصد أدائها العام. وهذا يمكن أن يساعد خاصة عند تدريب فنيين جدد.

الارتباط باختبارات منع تلازن الدم وتعادل الف وس

Correlation with HI and VN Tests

يمكن أن يؤدي الارتباط المصلي للإليزا باختبارات منع التلازن للدم وتعادل الفيروس مع عينات كافية مقارنةً بالمتوسط الهندسي لمعيار إليزا مع مثيلاتها في اختباري منع التلازن والتعادل. هذا يكون فقيراً جداً في حالة بناء الارتباط على مقارنة عينة مفردة.

تعليمات عامة General Comments

يجب أن يكون الحكم على مستويات الإليزا فقط على أسس القطيع مع أحجام العينة على الأقل من ٢٠ مصل لكل قطيع لاحم. يفضل ٣٠ عينة من القطيع في حالة قطعان الأمهات والبياض (30). يجب أن تستعمل اختبارات الإليزا للميكوبلازما للمسح ويجب أن تؤكد النتائج أو تنفى بواسطة اختبار منع التلازن المصلي أو المزرعة أو اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل.

References المراجع

1. Alexander, D. J., W. H. Allan, P. M. Biggs, C. D. Bracewell, J. H. Darbyshire, P. S. Dawson, A. H. Harris, F. T. W. Jordan, I. MacPherson, J. B. McFerran, C. J. Randall, J. C. Stuart, O. Swarbrick, and G. P. Wilding. A standard technique for hemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. Vet. Rec. 113:64. 1983.
2. Allan, W. H., and R. E. Gough. A standard hemagglutination inhibition test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. Vet. Rec. 95:120-123. 1974.
3. Alien, W. H., J. E. Lancaster, and B. Toth. Newcastle disease vaccines. Their production and use, FAO Animal Production and Health Series, No. 10. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 1978.
4. Anonymous. Methods for examining poultry biologies and for identifying and quantifying avian pathogens. National Academy of Sciences, Washington, D.C. pp. 83-87. 1971.
5. Beard, C. W. Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immuno-diffusion. Bull. W.H.O. 42:779-785. 1970.
6. Beard, C. W., S. R. Hopkins, and J. Hammond. Preparation of Newcastle disease virus hemagglutination-inhibition test antigen. Avian Dis. 19:692-699. 1975.
7. Beard, C. W., and W. J. Wilkes. A simple and rapid Micro-test procedure for determining Newcastle hemagglutination-inhibition (HI) antibody liters. In: Proceedings of the 77th Annual Meeting U.S. Animal Health Association, St. Louis, Mo. pp. 596-600. 1973.
8. Beard, C. W., and W. J. Wilkes. A comparison of Newcastle disease hemagglutination-inhibition test results from diagnostic laboratories in the southeastern United States. Avian Dis. 29:1048-1056. 1985.
9. Brugh, M. A., Jr. A simple method for recording and analyzing serological data. Avian Dis. 22:362-365. 1978.
10. Brugh, M. A., Jr., and C. W. Beard. Collection and processing of blood samples dried on paper for microassay of Newcastle disease virus and avian influenza virus antibodies. Am. J. Vet. Res. 41:1495-1498. 1980.
11. Brugh, M. A., Jr., C. W. Beard, and W. J. Wilkes. The influence of test conditions on Newcastle disease hemagglutination-inhibition titers. Avian Dis. 22:320-328. 1978.
12. Cottral, G. E., ed. Serology. In: Manual of standardized methods for veterinary microbiology. Comell University Press, Ithaca, N.Y. pp. 60-93. 1978.
13. Crowie, A. J. Immunodiffusion. Academic Press, New York. 1973.
14. Gelb, J., Jr., and C. G. Cianci. Detergent-treated Newcastle disease virus as an agar gel precipitin test antigen. Poult. Sci. 66:845-853. 1987.
15. Glazier, R. M. A simple apparatus for dark ground illumination of precipitin lines. J. Biol. Photogr. Assoc. 34:51-52. 1966.
16. Hirai, K., S. Shimakura, and M. Hirose. Immunodiffusion reaction to avian infectious bursal virus. Avian Dis. 16:961-964. 1972.
17. Jordan, F. T. W., and R. Chubb. The agar gel diffusion technique in the diagnosis of infectious laryngotracheitis (ILT) and its differentiation from fowl pox. Res. Vet. Sci. 3:245-255. 1962.
18. Kabat, E. A., and M. M. Mayer. Experimental immunochemistry. Charles C. Thomas, Springfield, 111. 1964.
19. King, D. J. A comparison of infectious bronchitis virus hemagglutination-inhibition test procedures. Avian Dis. 32:335-341. 1988.
20. Lukert, P. D., and R. B. Davis. An antigen used in the agar-gel precipitin reaction to detect avian encephalomyelitis virus antibodies. Avian Dis. 15:935-938. 1971.
21. McFerran, J. B., B. Adair, and T. J. Connor. Adenoviral antigens (CELO, QBV, GAL). Am. J. Vet. Res. 36(2):527-529. 1975.
22. Nonomura, I., and H. W. Yoder, Jr. Identification of avian mycoplasma isolates by the agar-gel precipitin test. Avian Dis. 21:370-381. 1977.
23. Olson, N. O., and R. Weiss. Similarity between artniritis virus and Fahey-Crawley virus. Avian Dis. 16:535-540. 1972.
24. Ranck, F. M., Jr. An easy method for making cutters to use in the agar-gel diffusion technique. Avian Dis. 17:870-873. 1973.

25. Reed, L. J., and H. Muench. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497. 1938.
26. Snyder, D. B., W. W. Marquardt, and E. Russek. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. II. Comparison of computational methods for measuring antibody titer in a single serum dilution. Avian Dis. 27:474-484. 1983.
27. Snyder, D. B., W. W. Marquardt, E. T. Mallinson, and E. Russek. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. Avian Dis. 27:161-170. 1983.
28. Snyder, D. B., W. W. Marquardt, E. T. Mallinson, P. K. Savage, and D. C. Alien. Rapid serological profiling using enzyme-linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. Avian Dis. 28:12-24. 1984.
29. Stone, H. A., and E. A. Holly. Reliability of the agar-gel precipitin test in Marek's disease studies. Avian Dis. 15:939-945. 1971.
30. Thayer, S. G., P. Villegas, and O. J. Fletcher. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays and conventional methods for avian serology. Avian Dis. 31:120-124. 1987.
31. Whittemore, A. D., and J. E. Williams. Microsystem for collecting and shipping diagnostic sera. Appl. Microbiol. 24:671-672. 1972.
32. Williams, C. A., and M. W. Chase. Methods in immunology and immunochemistry. Academic Press, New York. 3:103-374. 1971.
33. Williams, J. E. Collection of avian blood samples in microtest plates. Avian Dis. 17:445-449. 1973.
34. Williams, J. E. Microtest methodology. In: Isolation and identification of avian pathogens, 2nd ed. S. B. Hitchner, C. H. Domermuth, H. G. Purchase, and J. E. Williams, eds. American Association of Avian Pathologists, College Station, Tex. pp. 136-140. 1980.
35. Williams, J. E., and A. D. Whittemore. Serological diagnosis of pullorum disease with the microagglutination system. Appl. Microbiol. 21:394-399. 1971.
36. Witter, R. L. The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. Avian Dis. 6:478-492. 1962.
37. Woemie, H. The use of the agar gel diffusion technique in the identification of certain avian virus diseases. Veterinarian 4:17-28. 1966.



الفصل السابع والأربعون

طرق التعرف الجزيئية

MOLECULAR IDENTIFICATION PROCEDURES

دارال ج. جاكوود، ومارك و. جاكوود

Daral J. Jackwood and Mark W. Jackwood

الملخص Summary

استخدمت التقنية الحيوية لتطوير اختبارات تشخيصية جديدة لأمراض الطيور. يعتمد التعرف الجزيئي لمرضات الطيور على اكتشاف الحامض النووي (إما آر إن إيه أو دي إن إيه) الفريد لذلك المرض. بالإضافة إلى استخدام الحامض النووي للتعرف على النوع وتحت النوع والنمط والنوع المصلي والنوع المرضي وفي بعض الحالات العترات الفردية للعامل المسبب للمرض. تبنى الاختبارات التشخيصية الجزيئية على تقنيات جزيئية مثل التباين القصري لطول القطعة restriction fragment length polymorphism (RFLP)، والتهجين مع مسابير الحمض النووي hybridization with nucleic acid probe، وتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، وتباين الحمض النووي دي إن إيه المعظم العشوائي random amplified polymorphic DNA، وتتابع الحمض النووي nucleic acid sequencing. إن معرفة هذه التقنيات ضرورية لفهم وتقييم نتائج الاختبارات الجزيئية التشخيصية التي تبنى على هذه التقنية.

المقدمة Introduction

يتكون الحمض النووي دي إن إيه من قواعد بيورين أدينين [A] وجوانين [G] وبيرميدين سيتوزين [C] وثيمين [T] و يُكَوِّن تنظيمها الشفرة الوراثية. ترتبط القواعد معاً بواسطة سكر ديوكسي ريبوزي وروابط فوسفات التي تكون تركيب الشريط المفرد للحمض النووي دي إن إيه، وتمسك روابط الهيدروجين بين القواعد (أزواج A مع T وأزواج G مع C) بشريطي الحمض النووي دي إن إيه معاً (4).

مثل الحمض النووي دي إن إيه، يحتوي الحمض النووي آر إن إيه على قواعد باستثناء أنه بدلاً من T يحتوي على يوراسيل (U). الحمض النووي الريبوزي آر إن إيه عادة مفرد الشريط وليس ثابتاً مثل دي إن إيه. يحتوي

آر ان ايه على السكر الريبوزي وروابط فوسفات بينما دي إن إيه يستخدم سكر ديوكسي ريبوزي. يعمل حمض آر إن إيه المرسول كحامل للمعلومات الوراثية من الحمض دي إن إيه لتخليق البروتينات (4).

الشفرة الوراثية أو التتابع الفعلي للقواعد في مجين الكائنات فريدة من نوعها لكل الكائنات الحية. لذلك مجرد أن تتحدد الشفرة الوراثية ، يمكن أن تستعمل المعلومات للتعرف نوعياً على ممرضات الطيور بوجود المجين الخاص بها.

تعدد طول القطعة القصري

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

تستخدم هذه التقنية إنزيمات القصر لتحديد إذا ما تشابهت قطع الحمض النووي دي إن إيه. تقطع الإنزيمات الهاضمة الحمض النووي دي إن إيه مزدوج الشريط عند تتابعات معينة تسمى مواقع الإدراك. يهضم (يقطع) الحمض النووي بإنزيم خاص وتفصل الأشرطة الناتجة بالتحليل الكهربائي تبعاً لوزنها الجزيئي. في حالة عدم تماثل أحجام أشرطة الحمض النووي دي إن إيه ، سوف لا يتضاهى أو يتشابه شكل الأحزمة على الهلام ويمكن استخلاص أن تتابعات شريطي الحمض النووي دي إن إيه مختلفة عند مواقع الإدراك. إذا تضاهت أشكال الأحزمة ، تعتبر التتابعات متشابهة لكن تحتاج إلى اختبار إضافي لتوضيح أن قطعتي دي إن إيه متشابهتين لأن الإنزيمات الهاضمة تدرك فقط تتابعات النيوكليوتيدات القصيرة نسبياً.

يمكن أن يستخدم مجين الحمض دي إن إيه المعزول من عامل مسبب للمرض مجهول للتعرف على البكتيريا النوعية أو ميكوبلازما أو فيروس بمقارنة شكل القطع مع المقاييس المرجعية. إذا كان العامل مسبب المرض المراد اكتشافه يحتوي على مجين آر إن إيه مثل العديد من الفيروسات فإنه يمكن أن يتحول آر إن إيه إلى دي إن إيه باستخدام تقنية النسخ العكسي (RT). وعندما يعقب ذلك تكبير دي إن إيه بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل فإنه يمكن الحصول على دي إن إيه كافي لإنتاج بيانات تعدد طول القطعة القصري (انظر فقرة تفاعل البلمرة المتسلسل). تعرف هذه التقنية عامة أنها RT/PCR-RFLP.

في بعض الحالات يكون التعرف على العامل مسبب المرض محتملاً بالنظر ببساطة إلى وجود أو غياب مواقع إدراك القصر الإنزيمي أو اتحاد مواقع إدراك القصر الإنزيمي restriction endonuclease recognition sites. يجرى الاختبار مثل تعدد طول القطعة القصري (RFLP) تماماً فيما عدا أن حجم قطع دي إن إيه الناتج تكون غير مهمة. تكون النتائج إيجابية إذا قطع دي إن إيه عند أي موضع. لذلك أي تناقص في حجم الجزيء الأصلي لحمض دي إن إيه يكون دالاً على وجود موقع إدراك للقصر الإنزيمي. تجرى التقنية عادة على قطع قصيرة من دي إن إيه التي نتجت باستعمال RT/PCR وتسمى عامة RT/PCR-RE.

التهجـ ومسابـ ا مض النووي Hybridization and Nucleic Acid Probes

الكيفية الأساسية خلف الاختبار التشخيصى المبني على مسبار الحمض النـووي هـي التـزاوج أو الـتهجين، وتشمل ازدواج القاعدة (الرابط الـهيدروجيني) للتتابعات المتممة (G مع C و A مع T أو U) للحمض النووي دي إن إيه أو آر إن إيه (2).

في اختبار التهجين ، يجب أن يكون الحمض النووي مفرد الشريط. يتم دنترة الحمـض النـووي denaturation إلى أشرطة مفردة وعادة تتم بواسطة الحرارة أو المعاملة الكيميائية للعينة. عندئذ يـرتبط الحـمض النـووي (دنـترة) إلى دعامة صلبة (النيتروسيلليلوز أو مرشح النايلون). بعد ذلك، يخلط مسبار الحمض النووي مفرد الشريط مع الحمض النووي المتحد مع المرشح، في وجود الظروف التي تـشجع الـتهجين (2). الظروف الـتي يمكـن أن تـؤثر عـلى إمكانيـة تزاوج شريطي الحمض النووي من عدمه تعرف بالجدية (2). تتطلب الظروف عالية الجدية أن يتوافق ازدواج القواعد بين التتابعات المتممة تماماً. سوف تسمح الظروف منخفضة الجدية ببعض عـدم التوافـق لـزوج القاعـدة بـين تتابعـات الحمض النووي. شروط التفاعل التي تؤثر على التهجين هي نوع الحمض النووي (ازدواج القاعدة بين شـريطي دي إن إيه ليس قوياً مثل ازدواج قاعدة دي إن إيـه – آر إن إيـه)، وطـول تـابع الحـمض النـووي (العـدد الأكـبر لأزواج القاعدة المتمم يتزاوج أكثر قوة من العدد الأقل)، وتركيب القاعدة للأحمـاض النوويـة (ازدواج قاعـدة G-C يكـون أقوى من A-T أو A-U). درجة حرارة مخلـوط التفاعـل والقـوة الأيونيـة لمحلـول الـتهجين (تـؤثر عـلى كـلٍّ مـن روابـط الـهيدروجين بين القواعد) أيضاً تؤثر على التهجين.

توجد مسابير الحمض النووي لمعظم المرضات المهمة في الطب البيطري وتـستخدم كوسـائل تجريبيـة إذا كانت متوافرة من معامل أبحاث أو تتوافر من مصادر تجارية. في بعـض الحـالات هـذه المـصادرالتجارية توجـه المـسابير إلى اختبارات تشخيصية. مسبار الحمض النووي هـو قطعـة مفـردة الـشريط للحمـض دي إن إيـه أو آر إن إيـه الـتي تم تعليمها مسبقاً، ومن ثَم يمكـن اكتـشافها عقـب تفاعـل الـتهجين. لأن المنـاطق الفريـدة توجـد في تتـابع قواعـد في كـل الكائنات، يمكن تجهيز مسبار حمض نووي متمم مثل ذلـك الـذي يتـزاوج فقـط إلى منطقـة فريـدة ويكتـشف نوعيـاً العامل مسبب المرض (5). توجد عـدة طـرق للحـصول عـلى وتعلـيم مـسابير الحمـض النـووي (2). نموذجيـاً يجـب أن يعزل الجين من الكائن المراد اكتشافه، ثم يعلم بإما النظائر المشعة أو مواد غير مشعة. المعلمات غير المشعة هي الأكـثر جاذبية عن النظائر المشعة للاستخدام في الاختبارات التشخيصية لأنها ليست خطـرة للتـداول ويمكـن أن تخـزن لفـترة زمنية طويلة. اثنان من المعلمـات الأكـثر اسـتعمالاً هـمـا بيـوتين وديجوكـسيجنين – المـسابير المعلمـة بـالبيوتين تكتـشف بإنزيم ستربت أفيدين القاعدي الفوسفاتي (أو إنزيم آخر) المقترن ومادة مناسبة لإحداث تفاعل لوني مـشابه للإليـزا. في حالة المسابير المعلمة بالدجسوكسيجنين يضاف الجسم المضاد لديجوكسيجينين المقترن مـع إنزيـمات مختلفـة يمكـن أن تستخدم مع مادة مناسبة لإحداث تفاعل اللون. عندما يقـرن مـضاد الديجوكـسيجنين مـع الإنزيـمات مثـل الفوسـفاتيز

القاعدي ، يمكن أن تستخدم مادة مضيئة كيميائية والتي تبعث ضوءاً عندما تعرض لفيلم أشعة إكس معطية طريقة كشف حساسة جداً.

الأوليجونيكليوتايدات هي قصيرة (عادة ٣٠ - ٤٠ قاعدة نيوكلوتيدية في الطول) تصنع تخليقياً قطع دي إن إيه مفرد الشريط ، ويمكن أن تعلم وتستخدم كمسابير. يمكن أن يعلم أيضاً ويستخدم كمسبار الحمض النووي آر إن إيه.

تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

أحد أهم التطورات في البيولوجيا الجزيئية ، والأساس لاختبارات تشخيصية عديدة للعوامل المسببة للمرض في الدواجن هو تفاعل البلمرة المتسلسل. يعظم تفاعل البلمرة المتسلسل كميات صغيرة جداً من دي إن إيه إلى مستويات قابلة للكشف (1). يستخدم التفاعل تاك بولي ميريز دي إن إيه بولي ميريز الذي هو ثابت عند درجة حرارة عالية ليعظم أو يكبر المجين لعامل المرض. دي إن إيه بولي ميريز هو الإنزيم الذي يخلق أشرطة جديدة للحمض دي إن إيه. من المهم جداً أن يقاوم دراجات الحرارة العالية لأن الخطوة الأولى للتفاعل هي تسخين التفاعل حتى ٩٥ °م. مثالياً هناك ثلاثة خطوات في تفاعل البلمرة المتسلسل والتي تتكرر من ٣٠ – ٤٠ مرة. هذه الخطوات هي الدنترة عند ٩٥ °م denaturation ، والتزاوج مع البادئ عند ٣٧ - ٥٦ °م primer hybridization ، والبلمرة عند ٧٢ °م polymerization. يمكن برمجة صندوق تحكم حراري بالكمبيوتر بالدورات المتكررة بين هذه الدرجات الحرارية المختلفة مؤدياً إلى ميكنة تفاعل البلمرة.

عامة ، ليتزايد الحمض دي إن إيه فإنه يتراكب بواسطة زوج من البادئات المخلقة (قطع قصيرة من دي إن إيه) وتكون نوعية (متممة) للحمض النووي المراد تكبيره. يعامل الحمض دي إن إيه الهدف حرارياً ويترك البادئ ليتزاوج على الحمض النووي دي إن إيه بتخفيض الحرارة. عندما تتم خطوة البلمرة ينسخ التتابع بين البادئات منتجاً مرتين من الحمض دي إن إيه الأصلي الموجود في العينة. بتكرار الخطوات الثلاثة الدنترة والتهجين والبلمرة عدة مرات تتكون كمية كبيرة من الحمض النووي الهدف. عند استخدام الإنزيم الناسخ العكسي الذي يُخَلِّق دي إن إيه من القالب آر إن إيه في الخطوة الأولى للتفاعل يمكن أيضاً تكبير آر إن إيه المرسول وآر إن إيه الريبوزومي ومجين الفيروسات الريبوزية.

تتطلب الاختبارات التشخيصية تفاعل البلمرة لتكبير الحمض النووي للعوامل المسببة للمرض والموجودة في أعداد صغيرة ومن ثَم تزيد من حساسية الاختبار. يمكن عند ذلك أن يدرس الحمض دي إن إيه المُعَظَّم أكثر بمسبار حمض نووي نوعي أو بتحليل القصر الإنزيمي وتحليل تعداد طول القطعة القصري أو تتابع دي إن إيه.

ا مض النووي دي إن إيه العشوائي ا ك متعدد الأشكال (رابد)
Random Amplified Polymorphic DNA Analysis (RAPD)

تقنية رابد تعرف أيضاً بتفاعل البلمرة المتسلسل البادئ اعتباطاً arbitrarily primmed PCR (AP-PCR) قد تطورت بواسطة Williams *et al.* (8) و Welsh and McClelland (6). تستخدم هذه التقنية بوادئ قصيرة لها تتابع اعتباطي لتكبير مناطق عشوائية من الحمض دي إن إيه. تفصل هذه القطع بالتحليل الكهربائي وتكون الأشكال الناتجة دلائل لمناطق من الحمض الديوكسي ريبوزي المستهدف. لإجراء تقنية رابد، يعظم دي إن إيه المجيني المستهدف باستعمال بادئ له تتابع اعتباطي. هذا البادئ يكون عادة ١٠ – ١٢ قاعدة في الطول، لكن البادئات الأطول قد استخدمت. تفاعل البلمرة المستخدم لتحليل رابد يجرى تحت ظروف مثالية. نواتج التفاعل الخاص بالبلمرة المتسلل تعتمد على تتابع البادئ وطول البادئ وظروف التفاعل للإليزا. عند ثبات ظروف التفاعل والبادئ تكون دلائل رابد تناسخية جداً ومميزة لحمض دي إن إيه المستهدف.

تنقية رابد استخدمت أساساً لتوليد المواد المعلمة للخريطة الوراثية الكمية والتشخيص الجيني في النبات والحيوان (7). وحديثاً المواد المعلمة في تقنية رابد تستخدم للتعرف على أمراض الدواجن. هذه التقنية لها دور عظيم في التعرف على أمراض الدواجن المعقدة جينوم دي إن إيه لأنها لا تحتاج إلى معلومات عن تتبع هدف دي إن إيه (8, 7). وتم نشر مراجعة شاملة عن تحليل رابد (7).

تتابع ا مض النووي Nucleic Acid Sequencing

هي طريقة لتحديد ترتيب القواعد النيوكليوتيدية (A و C و G و T) في قطعة حمض نووي. تتابع نهاية سلسلة داي ديوكسي نيوكليوتيد سانجر هي طريقة تتابع قياسية تستخدم في معظم المعامل (3). حديثاً، تم ميكنة تتابع الحمض النووي. بالرغم أن الأدوات مكلفة وتتطلب مستوًى معيناً من الخبرة، إلا أن تتابع الحمض النووي يتوافر خلال عديد من شركات التقنية الحيوية التجارية (Lark Sequencing Technologies, Inc., Houston, Tex.) يعطي التتابع طريقة للتعرف النوعي للميكروبات اعتماداً على التتابع الفعلي للمجين الخاص بها. تضافر تتابع الحمض النووي مع تفاعل البلمرة يمكن أن يكون حساساً جداً كما أنه تقنية تشخيصية نوعية.

ا راجع References

1. Erlich, H. PCR technology. Stockton Press, New York, N.Y. 1989.
2. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y. 1989.
3. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463-5467. 1977.
4. Stryer, L. Biochemistry, 2nd ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, Calif. 1981.

5. Tenover, F. C. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 1:82-101. 1988.
6. Welsh, J., and M. McClelland. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Res. 19:5275-5279. 1991.
7. Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol. 218:704-740. 1993.
8. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafaiski, and S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535. 1990.

أنظمة كشف مولد الضد (الأنتيجين)

ANTIGEN DETECTION SYSTEMS

ساندرا س. كلاود

Sandra S. Cloud

الملخص Summary

يمكن أن العوامل المعدية أو أجزائها المكونة (أنتيجينات أو أحماض نووية) تكتشف في الأنسجة الطازجة أو المجمدة أو المثبتة باستعمال مختلف الاختبارات المباشرة وغير المباشرة. يمكن أن تتحور الاختبارات لتعطي حساسية ونوعية أكبر، لكن في معظم الحالات يتم اختيار الطرق الخاصة اعتماداً على طبيعة العينة والأدوات المتاحة ونوعية الكواشف والوقت والتكلفة والخبرة التقنية. يمكن مشاهدة الفيروسات أو البكتيريا مباشرة باستخدام المجهر الإلكتروني. على الرغم أن هذه الطريقة يمكن أن تجرى بسرعة لكنها غير حساسة وتتطلب أدوات متخصصة ودعماً تقنياً. بعض الاختبارات مثل تفاعلات التلازن أو الانتشار المناعي بسيطة وغير مكلفة لكنها يمكن أن تستخدم فقط للتعرف على العامل المسبب الذي يمتلك أنتيجينات ملزنة أو ذائبة على التوالي. تعطي التقنيات الأكثر تكلفة مثل الإليزا المرتبطة للأنتيجين أو الصباغة النسيجية المناعية الكيميائية أو التهجين الموضعي حساسية ونوعية أكثر، لكن قد تحتاج لنوعية كواشف أفضل وخطوات إضافية قبل الاختبار ومستوى أعلى من التدريب التقني. من المهم لتحديد أنظمة كشف الأنتيجين للأغراض التشخيصية والبحثية أن تتلاءم شروط الاختبارات مع فهم التأثير المرضي للعامل المسبب المشتبه في اختيار التوقيت ونوع عينات النسيج التي تستخدم للاختبار.

المقدمة Introduction

تم تطوير أنظمة كشف أنتيجين مختلفة طوال العشر سنوات الأخيرة. وأفضل هذه الأنظمة يجب أن يكون حساساً ونوعياً. تقاس الحساسية بالقدرة على كشف كميات صغيرة جداً من الأنتيجين. تقلل زيادة الحساسية لنظام الاختبار من عدد العينات السالبة الخطأ. تقاس النوعية بالمقدرة على كشف أنتيجين معين أثناء تحديد تفاعلات غير نوعية أو تفاعلات متصالبة مع الأنتيجينات قريبة الصلة. تقلل زيادة نوعية الاختبار من عدد العينات الموجبة الخطأ،

إلا أن العديد من أنظمة كشف الأنتيجين تنتقى بناءً على الأسباب التقنية مثل الكواشف أو إتاحة الأدوات، وطول فترة الاختبار، والتكلفة لكل اختبار، والميكنة، واحتياجات البيئة والأمان، والصعوبة التقنية، وهكذا. يناقش هذا الفصل عدة تقنيات شائعة تستخدم لكشف الأنتيجين للممرضات المختلفة التي تصيب الطيور. بنظرة عامة على كل بروتوكول يتضح مع بعض المراجع الحالية إعطاء خيارات تقنية مختلفة والتي قد تكون مفيدة في تطوير نظام الاختبار المناسب لكل معمل على حدة.

ا هر الإلكترو النافذ Transmission Electron Microscopy (TEM)

يمكن مشاهدة عوامل معدية متعددة مباشرة بواسطة المجهر الإلكتروني النافذ عقب التنقية والطرد المركزي عالي السرعة لعينات الأنسجة المشتبهة (10 ,24). إن تطور الطرد المركزي فائق السرعة للعينات مباشرة إلى شبكات المجهر النافذ قد حسنت جداً من طرق الكشف الأنتيجيني (14). استعملت تقنيات الصباغة السلبية باستخدام حمض الفوسفوتنجستيك الضوئي وخلات اليورانيل لزيادة الوضوح، لكن في بعض الأحيان قد تفقد الفيروسات أو البكتيريا البروزات المميزة وقد تكون متباعدة جداً على الشبكة أو بين البقايا لعمل التعرف الإيجابي. هذه التقنية غير حساسة نسبياً مع مستوى الكشف الأدنى الحرج لجزيئات الفيروس $١٠^{-٦}$ - $١٠^{-٧}$ لكل ملليتر تقريباً.

ا هر الإلكترو ا ناعي Immune Electron Microscopy

يمكن زيادة حساسية المجهر الإلكتروني النافذ بإضافة مضادات أمصال أحادية أو عديدة النسيلة عالية النوعية عقب التنقية لكن قبل الطرد المركزي. اصطلحت هذه الطريقة بالمجهر الإلكتروني النافذ المناعي immune TEM أو المجهر الإلكتروني المناعي IEM (30). يتطلب مركب الأنتيجين–الجسم المضاد المكون فقط للطرد المركزي منخفض السرعة لوضع الشبكات. بديلاً عن ذلك، قد يدمج الجسم المضاد مباشرة إلى سحبات مغلفة للشبكات مكوناً السطح لاجتذاب الأنتيجين (10). حديثاً جداً، تم تطوير اختبار المجهر الإلكتروني المناعي غير المباشر باستخدام الذهب مع بروتين A، وثبت أنه طريقة حساسة سريعة لكشف الفيروسات التاجية خاصةً المعوية منها (9). تركز العينات بالطرد المركزي عالي السرعة مباشرة على شبكات النيكل. عقب طرق الغسيل المختلفة، تحضن الشبكات المغلفة بالفيروس على قطرة من المصل فائق المناعة. عقب خطوات الغسيل الإضافية تحضن الشبكات مع قطرة من مركب بروتين A المختلط مع الذهب وتغسل وتصبغ مع ٢٪ فوسفوتنجستات الصوديوم. يظهر المركب السابق خلفيات غير نوعية قليلة تعمل كمعلم كثيف الإلكترون وتجعل كشف الأنتيجين أسهل وتعطي زيادة من ١٠ – ٥٠ مرة في الحساسية عن المجهر النافذ (9).

العيب في أي نظام يستخدم المجهر النافذ هو توفر المجهر وأعضاء الدعم، إلا أنه إذا اشتبه في العامل المعدي الذي قد يكون غير قابل للزرع في أنظمة العزل التقليدية، فإن المجهر النافذ أو المجهر المناعي يقدم طريقة جيدة للفحص (10).

اختبار تلازن الدم Haemagglutination test (HA)

الأنتيجينات الملزنة للدم هي بروتينات نشوية glycoproteins تتكون على سطح العديد من العوامل المسببة للمرض. يمكن أن تكتشف هذه الأنتيجينات بسهولة بإضافة خلايا دم حمراء من الأنواع التي تحمل مستقبلات متممة (10)، إلا أن بعض العوامل المعدية مثل فيروس الالتهاب الشعبي المعدي قد يتطلب معاملة مسبقة بإنزيمات ليكشف ملزنات الدم السطحية (انظر الفصل الثاني والثلاثون).

إذا حقنت مواد من مسحات القصبة الهوائية في أجنة خالية من الممرضات النوعية، يمكن اكتشاف العامل الملزن للدم بسرعة بخلط حوالى ٠,٠٥ مل من ١٠٪ كرات دم حمراء مغسولة مع ٠,٥ مل من السوائل السقائية المجموعة على شريحة زجاجية (اختبار بقعة تلازن الدم spot test). في حالة حدوث تلازن، يمكن أن يظهر وقد يتم التعرف على العامل الملزن بواسطة اختبار منع تلازن الدم (HI) الموضح بالفصل السادس والأربعون. لأن بعض البكتيريا قد تلزن خلايا الدم الحمراء، يجب فحص التلوث البكتيري بزراعة العينة على بيئة ميكروبية أو بتكرار تفاعل التلازن على السوائل عقب الترشيح خلال مرشح محقن ٠,٢ ميكروملي قبل إجراء اختبارات التلازن ومنع التلازن الدموي.

الانتشار المناعي Immunodiffusion

يمكن أن تكتشف الأنتيجينات الفيروسية الذائبة الموجودة في النسيج المطحون وسوائل البيض وسوائل مزرعة النسيج وهكذا باستخدام الانتشار المناعي في اختبار الانتشار المناعي في هلام الآجار (AGID). تم وصف هذا الاختبار سابقاً.

اختبار الانتشار المناعي في الآجار هو اختبار بسيط جداً وغير مكلف. على سبيل المثال فيروس مرض البيرسا المعدي (جمبورو) أو البيرسا المصابة أو الأغشية الكوريوالانتويس من الأجنة المصابة بفيروس ريو يمكن أن تحضر كمتجانس ٥٠٪ (وزن/حجم) في محلول ملح منظم الفوسفات باستخدام طاحن النسيج أو الهون. بعد ثلاث دورات من التجميد والإذابة، يطرد الخليط المتجانس مركزياً على سرعة منخفضة ويستخدم الرائق كأنتيجين للاختبار (الانتشار المناعي). يمكن أن تستخدم السوائل الرائقة من مزارع الخلية المصابة أيضاً في نظام كشف الأنتيجين، إلا أن بعض الأنتيجينات قد لا تكون ذائبة ولا تنتشر خلال الآجار أو يكون تركيز الأنتيجين تحت حد الكشف في الاختبار. قد يسمح المعاملة بالمنظفات أو تركيز الأنتيجين على التوالي باستعمال اختبار الانتشار المناعي،

لكن طرق كشف الأنتيجين الأخرى قد تكون أكثر ملائمةً في هذه الحالات. إذا أمكن اكتشاف الأنتيجين باستعمال نظام اختبار الانتشار المناعي، يمكن أيضاً قياسه باستخدام اختبار مانشيني للانتشار المناعي القطري أو الفصل الكهربي المناعي Mancini radial immunodiffusion test or rocket immunoelectrophoresis (4).

الإليزا جاذبة الأنتيج

Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (AC-ELISA)

يمكن اكتشاف الأنتيجين في تحضيرات النسيج باستخدام تقنية أقلمة الإليزا المشروحة في الفصل السادس والأربعون. هذه الأقلمة اصطلحت على أنها إليزا جاذبة الأنتيجين (AC-ELISA)، وتم استخدامها لاكتشاف ميكوبلازما الطيور وفيروس جمبورو والفيروسات المعوية وفيروس الالتهاب الشعبي المعدي وفيروس التهاب المخ الطيري (2, 15, 16, 26, 31, 33, 35). هذه التقنية بسيطة نسبياً واختبار سريع يعطى بديلاً للمعامل حيث لا تتاح عينات النسيج للصباغة النسيجية المناعية. يستطيع الاختبار قياس الأنتيجينات الحية المعدية وغير المعدية أو الأنتيجينات الميتة (15) وهي أكثر حساسية من اختبار الانتشار المناعي (31)، لكن أقل حساسية من الطرق التقليدية مثل عزل الفيروس في أجنة البيض إذا لم يجرى بعض التغذية الأولية للأنتيجين (2, 26).

ا سم ا ضاد الأو ا اذب Primary Capture Antibody

تضم الطريقة الأساسية ربط الجسم المضاد الجاذب لأطباق إليزا خاصة التصميم خلال سلسلة من الخطوات. تغطى الأطباق ببروتين A من المكور العنقودي الذهبي (33) أو مركب أفيدين-بيوتين (15) قبل إضافة الجسم المضاد الجاذب وثبت أنها تزيد المقدرة على اجتذاب الأنتيجين. قد يكون الجسم المضاد الجاذب عديداً أو أحادي النسيلة اعتماداً على الغرض من نظام الاختبار. مضادات المصل عديدة النسائل عالية الجودة أكثر حساسية في مسح العينات للأنتيجين (16)، بينما الجسم المضاد وحيد النسيلة يكون أكثر فائدة في التعرف على وجود أنتيجين مصلي معين (26)، إلا أن مضاد المصل متعدد النسيلة النوعي جداً يمكن أن يحضر بالادمصاص مع تركيزات مختلفة مع الأنتيجينات المغايرة ذات الصلة (2).

الربط الأنتيجي Antigen Binding

عقب خطوات الغسيل المختلفة، الأنسجة المطحونة حديثة التجميع أو العينات السابق حقنها في وسط مزرعة مناسب للتغذية (2, 26) تضاف إلى حفر الاختبار وتحضن مع الجسم المضاد الجاذب المرتبط مع سطح الطبق. إذا أدرك الأنتيجين بواسطة الجسم المضاد فسوف يجتذب على الطبق، والأنتيجين غير المجتذب سوف يغسل بعيداً، وقد يتطلب

خطوات إضافية في تحضير الأنتيجين لأن بعض الأنتيجينات قد تحتاج للتعرض بواسطة الإنزيم أو المعاملة بالمنظف أو يزرع سابقاً قبل المسح (26). الزراعة السابقة قد تدخل أخطاء جديدة للنظام. على سبيل المثال تميل الميكوبلازما للاتحاد مع جلوبيولينات جاما من بيئة الزرع على سطحها والتي قد تعطي تفاعلات إيجابية كاذبة (2).

ا سم ا ضاد الكاشف Detector Antibody

بعد خطوات الغسيل الإضافية يضاف الجسم المضاد الثانوي أو الكاشف. قد يلصق الجسم المضاد الكاشف مباشرة مع إنزيم مثل هورسرادش بيرأوكسيداز (38) أو بيوتين (33)، لكنه يترك عادة غير ملصق في معظم الطرق. عقب التحضين مع الجسم المضاد الكاشف غير الملصق، يضاف الجسم المضاد المقترن بالإنزيم. بمجرد إضافة المواد المناسبة إلى الاختبار، يكتشف الأنتيجين المجتذب بواسطة تغير اللون ويسجل على هيئة كثافة ضوئية أو قيم امتصاص مقارنة بالضوابط. يمكن اكتشاف الأنواع الأنتيجينية المتخصصة باستعمال الجسم المضاد أحادي النسيلة في الإليزا جاذبة الأنتيجين (26 ,33) أو الإليزا قد تتغير إلى اختبار تنافس أو تثبيط (35).

ا ساسية والنوعية Sensitivity and Specificity

تعتمد حساسية ونوعية هذا النظام الكاشف للأنتيجين مباشرة على اختيار الكواشف والطرق. يجب أخذ الحرص في اختيار أطباق أفضل ومحاليل التغليف ومحاليل التعطيل وفترات التحضين والحرارة والأجسام المضادة. تعرف عادة أفضل الطرق بالمحاولة والخطأ باستعمال عينات ضابطة إيجابية أو سلبية لأنتيجين معين. على النقيض لأنظمة اختبار الصباغة الخلوية الكيميائية المناعية، الكواشف والتفاعلات الضرورية لإجراء الإليزا جاذبة الأنتيجين يجب أن يكون لها تأثيرات مزيلة أقل على مواقع الأنتيجين الحرجة والتي قد تسمح باكتشاف أفضل أو زيادة الحساسية.

الصباغة النسيجية الكيميائية ا ناعية Immunohistochemical Staining (IHS)

الأنتيجين في معلق الخلايا الطازجة أو المجمد أو المثبت أو النسيج الكامل يمكن اكتشافه باستخدام أجسام مضادة نوعية متحدة مع صبغات أو إنزيمات. تعرف هذه العملية بالصبغ النسيجي المناعي. استخدام هذا النظام لرؤية الأنتيجين في الخلايا أو النسيج المصاب بفيروس التهاب الحنجرة والقصبة الوبائي، والالتهاب الشعبي المعدي، وفيروس مرض جمبورو، وفيروس أدينو، وفيروس الإنفلونزا، وفيروس الالتهاب المعوي في البط، وفيروس مرض نيوكاسيل، وفيروس التهاب المخ الطيري، وفيروس أنيميا الدجاج (1, 5, 7, 8, 11, 17, 18, 20, 26, 32, 34, 37). قد يكون فهم وتشخيص عملية العدوى بالتقييم النسيجي العادي محدوداً بعدد قليل من الخلايا أو الأنسجة لتقييم وجود النخر الشديد. بالإضافة إلى ذلك عند توافر البيانات المصلية قد تكون النتائج صعبة للحكم في حالة فشل

النظام المناعي. تسمح تقنية الصبغ المناعي بالوصف المورفولوجي للعامل المعدي وإيجاد الارتباط مع التغيرات الخلوية المرضية أو تطور الآفات إذا جمعت عينات النسيج في الوقت المناسب أثناء العدوى. لهذا السبب يستخدم هذا النظام في دراسات كيفية حدوث المرض. مع الضوابط المناسبة، تستخدم النتائج الإيجابية في تشخيص أمراض الطيور النوعية، إلا أن النتائج السالبة يجب أن تقيم بحرص (6). يجب أن يكون اختبار الصبغ المناعي النسيجي الجيد بسيطاً تقنياً لتقليل الأخطاء وغير مكلف ويسمح بتكبير كافي للعلامة لرؤية سهلة. الأكثر أهمية، يجب أن يكون النظام قادراً على كشف الأنتيجين الذي قد تغير تركيبياً بالتثبيت مناعياً.

تثبيت الخلية أو النسيج Cell or Tissue Fixation

يمكن أن تستخدم الخلايا غير المثبتة أو مزارع النسيج للصبغ المناعي (5)، لكن هذا يتطلب أن تفحص التحضيرات سريعاً. تثبت الخلايا أو عينات النسيج الكامل عادة بطريقة واحدة من عدة طرق لعمل هذا الاختبار. على سبيل المثال السطح حديث القطع من الغدة التوتية أو عينة نخاع العظم أو كحتات الغشاء المخاطي للقصبة قد تضغط على شريحة زجاجية بسلاح المشرط وتزال. تجفف الطبقة الرقيقة من الخلايا المطبوعة على الشريحة بالهواء وتثبت بالأسيتون لعشر دقائق (1 ,22). تحفظ هذه الشرائح عند −٢٠ °م حتى تصبغ. الخلايا المصابة المزروعة على مزرعة نسيج قد توضع على شرائح وتثبت بطريقة مماثلة (38). قد تصمم شرائح المجهر خصيصاً مع غطاء من التيفلون Teflon لتسمح بعدد من العينات على شريحة واحدة. غطاء التيفلون المحيط بالمنطقة الملاصقة للخلية يسمح باحتجاز الجسم المضاد الأولي في مساحة صغيرة. حجم هذه المنطقة يمكن أن يضبط للمحافظة على الكواشف المستعملة للاختبار المباشر أو غير المباشر.

يمكن أن تستخدم قطاعات النسيج المجمدة بالتجميد السريع للنسيج في أيزوبنتان isopentane سابق التبريد مع النيتروجين السائل وبعد ذلك تقطع بالكريوستات، إلا أنه في معظم الحالات تثبت الأنسجة عند درجة حرارة الغرفة في فورمالين متعادل ١٠٪ للفحص النسيجي الروتيني. في حالة عمل الصبغ المناعي، لا يجب حفظ الأنسجة في مثبتات الفورمالين لأكثر من ٢٤ — ٤٨ ساعة قبل الإعداد بسبب إمكانية تدهور الأنتيجينية لدرجات متفاوتة (13 ,19). يربط الفورمالين تصالبياً عديد الببتيدات بتكوين جسور ميثيللين التي يمكن أن تخفى أو تغير الأنتيجينات. بعض الأنتيجينات قد لا تخفى بمعاملة قطاعات النسيج بالإنزيمات محللة البروتين قبل الصبغ المناعي. نشر أن فيروس أنيميا الدجاج يصعب كشفه بعد التثبيت بالفورمالين إذا كانت فترات التثبيت طويلة جداً (أكثر من ست ساعات) أو إذا اُستخدمت العوامل المحللة التي تحتوي على ١٠٪ حمض فورميك و ١٠٪ فورمالين، ويحدث صبغاً مناعياً قليلاً جداً بغض النظر إلى المعاملة بمحللات البروتين (32). المثبتات الأخرى المحتوية على مكونات مختلفة من الكحول الميثيلي وفورمالدهيد وحمض الخليك أو الزنك الذي يفترض تثبيطه للارتباط التصالبي المسبب بالفورمالدهايد قد

استخدمت. Fitzgerald و Richard (12) أخبرا عن الاستعمال الفعال جداً للمثبتات غير الفورمالينية المتاحة تجارياً لكشف أنتيجينات الفيروس داخل الأنوية لفيروس أدينو الطيور مجموعة II باستعمال تقنية الصبغ المناعي. هذا الناتج لايحفز الارتباط التصالبي، ولكن يحفظ مواقع الأنتيجين ولا يحتاج النسيج معاملة بمحللات البروتين. لأن العديد من المثبتات أو أن طول فترة التثبيت يمكن أن تسبب نتائج مختلفة لأنتيجين معين، يجب أن تكون الطرق قياسية لكل مركب حتى نصل إلى نظم كشفية مرضية وعالية الدقة.

عقب التثبيت، تغمر الأنسجة في البارفين وتقطع إلى قطاعات لتجنب دمار إضافي للنسيج ويجب ألا تتعدى حرارة التخلل البارافيني ٦٠ ْم (13 ,19). يجب وضع قطاعات النسيج على شرائح مغطاة بمواد لاصقة مثل بولي-L-ليسين أو بولي-D-ليسين أو ٣-أمينو بروبيل ترايسوكسي سيلان. عقب إزالة البارافين القياسية، يعاد الماء للشرائح ويعد للصبغة.

ا عاملات ا سبقة للنسيج Tissue Pretreatments

لأن العديد من أنظمة الصبغ المناعي تستخدم طريقة صباغة بيروكسيداز، يجب أن يوقف نشاط بيروكسيداز الداخلي داخل نسيج معين بالغمر في تركيزات منخفضة لفوق أكسيد الهيدروجين. تثبيط الإنزيمات النسيجية الداخلية يجب أن تجرى قبل الهضم بمحللات البروتين لتقليل تأثير فوق أكسيد الهيدروجين على أنتيجينات النسيج (13).

قد يتطلب الهضم الإنزيمي تحفيز الجسم المضاد في عملية الصبغ المناعي ولتقليل الارتباطات التصالبية بين مواقع البروتين، ومن ثم زيادة إدراك الأنتيجين بالأجسام المضادة الأولية (4 ,13 ,19). يجب لكل أنتيجين أن يحدد الهضم الإنزيمي بالتربسين وبروتياز وهكذا باستعمال تركيزات مختلفة وفترات زمنية على قطاعات تسلسلية لنسيج معلوم سالب وموجب. على سبيل المثال استعمال بروتياز XIV لمدة ٧ — ١٠ دقائق يعطي نتائج أفضل من المعاملة بالتربسين في الأنسجة المحتوية على فيروس أنيميا الدجاج (32). لا تتطلب غالبية الأجسام المضادة للبكتيريا والفطريات والطفيليات الأولية هذه المعاملة (6).

قبيل التحضين مع الجسم المضاد الأولي يجب معاملة الشرائح بـ ٢٪ - ٥٪ مصل عادي من أنواع غير ذات صلة أو، إذا اُستخدم الصبغ غير المباشر من أنواع يجهز فيها الجسم المضاد الثانوي، يمكن أن تحدث إيجابيات زائفة نتيجة للتفاعلات التصالبية للجسم المضاد الثانوي خاصة للخلايا الالتهابية التي بها مستقبلات قطع المتمم Fc على سطحها (13).

الصبغ ا باشر Direct Staining

يتطلب هذا النظام أن يعرف الجسم المضاد النوعي للأنتيجين الأولي مع صبغة الفلورسين أو إنزيم ويحضن مع عينة النسيج. الفلوروسين هو صبغة تستطيع أن تستحوذ بسرعة بعد تعرض قصير للأشعة فوق البنفسجية، إلا أنها تستخدم بنجاح لعدة سنوات على الأنسجة الحديثة أو المجمدة (5 ,23). تساعد الأجسام المضادة المعرفة بالإنزيم في خلق تقنيات صباغة توضح الأنتيجينات في عينات النسيج المشتبه الظاهرة بالمجهر الضوئي. يكون منتج تفاعل الإنزيم-المادة مستديمة ويمكن أن تستخدم على الأنسجة المثبتة.

يجب أن يكون الجسم المضاد الأولي جسماً مضاداً عديد النسيلة أو أحادي النسيلة وعالي النوعية لتقليل الارتباط غير النوعي ويجب استخدام أعلى تخفيف ممكن الذي يعطي صباغة نوعية. يجب أن يعد الجسم المضاد الأولي عديد الصفة في أنواع ليس لها صلة بنوع نسيج العائل قيد الفحص، ومن ثم متجنباً الصباغة كنتيجة للأجسام المضادة المتفاعلة تصالبياً وغير النوعية (13). في هذا الخصوص، يتضح أن الأجسام المضادة أحادية النسيلة هي أفضل اختيار، لكن في الأنسجة المثبتة بالفورمالين قد يتدمر الموقع الخاص للكشف أثناء الإعداد (13 ,19). قد يتحد الجسم المضاد عديد النسيلة بأنتيجين متغير. يستطيع خليط الأجسام المضادة أحادية النسيلة المتعددة أن يدرك المواقع المختلفة لأنتيجين معين وقد يكون متفاعل أفضل (13).

يجب أن يلاحظ الأنتيجين المرتبط مع الجسم المضاد المعرف بالفلورسين بالمجهر باستخدام مصدر ضوء أشعة فوق بنفسجية. يجب أن تحضن العينات مع الجسم المضاد المعرف بالإنزيم مع مواد مناسبة لتحدث ترسيباً للتفاعل الملون غير الذائب عند موضع ارتباط الجسم المضاد مع الأنتيجين للرؤية بالمجهر الضوئي. تعتبر الصباغة النسيجية الكيميائية المناعية المباشرة سهلة واقتصادية لكن تحتاج إلى جسم مضاد أولي مقترن بصبغة الفلورسين أو أنزيم. عملية التعريف المطلوبة لربط صبغة الفلورسين نفسها قد تغير قدرة الاتحاد لجزيء الجسم المضاد الأولي (13). بالإضافة إلى ذلك فإن استخدام الصبغ المباشر يقدم تكبيراً قليلاً للأنتيجينات التي قد تتكون بمستويات قليلة جداً (6 ,10).

الصبغ غ ا باشر Indirect Staining

يستخدم أكثر من الصبغ المباشر. يحضن الجسم المضاد الأولي الخاص بالأنتيجين غير معروف مع عينة النسيج وبعد عدة خطوات غسيل يضاف الجسم المضاد الثانوي المعرف بالفلورسين أو الأنزيم أو البيوتين. يتوفر الجسم المضاد الثانوي تجارياً كجسم مضاد للجلوبيولين المناعي G (IgG) للحيوان المستخدم لتحضير الجسم المضاد الأولى (6 ,13). المعامل التي تجهز لنفسها مضادات الأجسام الثانوية يمكن أن تختبرها على نوع مناسب من قطاعات أنسجة لمفية. خلايا البلازما وخلايا المجموعة B يمكن استخدامها بنجاح. في هذه الطريقة تحدث المشاهدة بعد استقبال الجسم المضاد الثانوي المعرف بالفلورسين أو الإنزيم، ويشاهد التألق مباشرة بمجهر الأشعة فوق البنفسجية لكن

للأجسام المضادة المعرفة بالإنزيم، والتحضين مع المادة الملونة يكون ضرورياً قبل المشاهدة. هذه الطريقة معقدة أكثر من الطريقة المباشرة، لكن الطريقة المباشرة لا تتطلب اقتران الجسم المضاد الأولي والفلورسين أو الأنزيم المتاح تجارياً المقترن مع الجسم المضاد الثانوي قد يستخدم مع العديد من الأجسام المضادة الأولية. الأكثر أهمية، لأن العديد من جزيئات الجسم المضاد الثانوي قد تتحد مع الجسم المضاد الأولي المفرد، فحساسية هذا الاختبار تزداد بتقوية علامة الكشف (13, 4).

يمكن زيادة حساسية الصبغ المناعي باستخدام مركب أفيدين-بيوتين-بيرأوكسيداز أو مركب ستربت أفيدين-بيوتين-بيروأكسيداز بواسطة استنفاذ القدرة عالية الارتباط للبيوتين مع الأفيدين وجليكوبروتين زلال البيض. أيضاً يرتبط ستربت أفيدين مع بيوتين، لكن ينتج بواسطة البكتيريا وقد يكون أكثر ملائمة لكشف العوامل المسببة للمرض في الطيور. في هذا النظام يحضن الجسم المضاد الأولي غير المعروف مع عينة النسيج. بعد الغسيل يحضن الجسم المضاد الثانوي المعرف بالبيوتين الموجه للجلوبيولين المناعي IgG للحيوان المستخدم لتحضير الجسم المضاد الأولي على عينة النسيج. بعد الغسيل يضاف مركب أفيدين أوستربت أفيدين المعرف بإنزيم بيروأكسيداز وتضاف المواد المتفاعلة عقب الغسلة الثالثة. يتضح أن هذا النظام أكثر استهلاكاً للوقت والتكلفة لكنه يقدم تكبيراً أكبر للأنتيجينات الضئيلة. المركب السابق بالاتحاد مع الجسم المضاد أحادي النسيلة اتضح أنه يعطي نتائج أفضل لكشف بعض الأنتيجينات (8, 25, 28, 34)، إلا أن البيوتين الداخلي الموجود في الكبد أو الكلى (6) يجعله صعباً للاستخدام في كشف الأنتيجين في بعض الأنسجة.

الحساسية والنوعية Sensitivity and Specificity

قد تختلف تبعاً للطرق والكواشف وهكذا. يُفضل الرجوع إلى نصوص عديدة وأبحاث مرجعية على الصبغ المناعي (4, 6, 13) قبل محاولة هذا الاختبار ذات فائدة.

التهجين الموضعي الكيميائي النسيجي
In Situ Hybridization Histochemistry (ISHH)

هي طريقة تحديد موقع تتابع حمض نووي فريد في قطاع نسيج مثبت بالفورمالين أو في عينة تم نقلها إلى غشاء النيتروسيلليلوز (تهجين الشف النقطي dot-blot hybridization). يضم هذا النظام للكشف الأنتيجيني طرق الصبغ المناعي النسيجي وبعض الأساسيات البيولوجية الجزيئية. وللمزيد عن طرق الكشف الجزيئية انظر الفصل السابع والأربعون.

يمكن من خلال خطوات فيزيائية وكيميائية مختلفة فصل الحمض النووي دي إن إيه مزدوج الشريط إلى شرائط منفصلة يمكن أن تعيد الارتباط ببعضها وترتبط تنافسياً إلى شريط متمم مشابه أو قريب (المسبار probe) معلم

بنظائر مشعة أو إنزيم أو بروتين. وهو نظام كشف عالي الحساسية يستعمل في بعض معامل التشخيص والبحوث للتعرف على الفيروسات (1, 3, 27, 29, 36). يسهل توافر المسابير المعلمة بالنظائر غير المشعة وأطقم التهجين التجارية استخدام التهجين الموضعي الكيميائي النسيجي. بالمقارنة بتقنية الكيمياء المناعية النسيجية يمكن أن يسهل هذا النظام اكتشاف الأنماط الكامنة المعدية والأنتيجينية باستعمال مسابير عالية التخصص، لكن الخبرة المطلوبة والتكاليف قد لا توجد في معامل عدة.

ضـ النسيج Tissue Preparation

تجهز قطاعات البارفين أو قطاعات متجمدة أو مسحات نسيج بنفس الطريقة في الصبغ المناعي النسيجي. يكون التثبيت حرجاً لحفظ الشكل الخلوي لأفضل مسبار محدد للموقع والتعرف على الخلايا المعلمة (3). يساعد التثبيت المفاجئ أو التجميد السريع في إبقاء الأحماض النووية. مثبتات ألدهايد مثل الفورمالين ترتبط تصالبياً للحمض النووي دي إن إيه مع بروتينات هستون histone التي تمنع التهجين بطريقة مرتبطة بالزمن. قد تبقي المثبتات المعتمدة على بارافورمالدهيد أكثر التركيبات الشكلية النسيجية (21). تفضل الشرائح المعاملة بمركب ٣-أمينوبروبيك تراي إيثوكسي سيلان لقطاعات النسيج المستخدمة مع التهجين الموضعي لأن درجات الحرارة العالية ومعاملات الإنزيم عادة تفصل النسيج من الشرائح غير المعالجة (3, 21). لا يجب أن يستخدم الجيلاتين في الحمام المائي أثناء التقطيع والإزالة الكاملة لشمع البارافين تكون حرجة لتفادي التفاعلات غير النوعية (21). كما وصف سابقاً يجب أن تستحوذ أنشطة الإنزيم الداخلي ويعالج النسيج بمركبات (الإنزيمات المحللة للبروتين وهكذا) لزيارة نفاذية الخلية. يساهم أيضاً الهضم الإنزيمي في فصل البروتينات المتحدة للأحماض النووية دي إن إيه أو آر إن إيه لتسمح بحصول المسبار على الارتباط والاتحاد. يجب أن تجرى كل عمليات الهضم الإنزيمي بالإنزيمات الخالية من نيوكلييز.

اختيار ا سبار Probe Selection

المسبار هو تتابع نوعي لنيوكليوتيدات مخلقة أو مستنسخة محضرة للتعرف والاتحاد بمنطقة معينة للحمض النووي دي إن إيه أو آر إن إيه. تتحد النيوكليوتيدات المعلمة مع التتابع أو تضاف كوصلة. ترتبط المسابير الطويلة أكثر بالنيوكلوتيدات المعلمة لكشف أفضل، إلا أن طول المسبار يؤثر على معدل اختراق الخلية (21). بالرغم من النظر لاستعمال النظائر المشعة أنها أكثر حساسية، إلا أنها غير عملية لمعظم المعامل لمشاكل الأمان والتخلص منها. تفضل النظائر غير المشعة وتنتج باندماج النيوكليوتيدات إلى الجزيئات المقررة مثل بيوتين أو ديجوكسيجنين أو فلوروسين.

التهجن Hybridization

في التحضير للتهجين، يوقف تفاعلات الإنزيم الهاضم بدورات غسيل كثيرة. يجب أن يكون المسبار وأهدافه مفردة الشريط لتهجين ناجح. عادة يصاحب دنترة الحمض النووي دي إن إيه بالتسخين في وجود فورماميد عند ٩٢ – ٩٦° م لمدة ٦ – ١٠ دقائق، إلا أن كل معمل سوف يحتاج لتقييم الحرارة الأفضل التي تنتج أفضل علامة بدون تغيير في شكل الخلية. قد تشمل بعض البروتوكولات الطرق لزيادة نفاذية النسيج لزيادة الحصول على المسابير. عادة يصاحب ذلك بإضافة المنظفات (ترايتون x–١٠٠ أو توين-٢٠، شركة سيجما) (Triton X-100 or Tween-20, Sigma, St. Louis, Mo.) إلى محاليل الغسيل المختلفة (21).

لتطوير تهجين موضعي ناجح، يجب أن تكون درجة حرارة الذوبان للهجن مزدوجة الشريط المبنية على تركيب نيوكليوتيدات معروفة ودرجة حرارة التحضين تحت التحكم. إذا سمح بتفاوت درجة الحرارة فإن الفيروسات غير المتماثلة سوف تكتشف. بمجرد حدوث التهجين يجب إزالة المسبار غير المرتبط. حساسية ونوعية الاختبار هي وظيفة كم عدد جزيئات المسبار تهجن إلى الهدف الفعلي مقابل المواضع غير النوعية وكيف يرتبط المسبار بقوة.

يطلق على مجموعة الظروف التجريبية مثل تركيزات الملح ودرجة الحرارة وهكذا التي يمكن أن تؤثر على خواص الارتباط للمسبار القريب لكنه غير المماثل بالحيطية stringency. تحت ظروف قلة الحيطية يسمح ببعض الاختلاف للنيوكليوتيدات بين الهدف والمسبار، بينما تحت الجدية العالية يتكون أزواج مختلفة قليلة جداً (21).

الصبغ النسيجي ا ناعي Immunohistologic Staining

مجرد حدوث التهجين وغسل كل المسبار غير المرتبط، يكتشف الأنتيجين برؤية المسبار المعلم أو المُعَنوَن. يمكن أن يفعل هذا مباشرة أو غير مباشر كما وصف في الصبغ المناعي. في الطريقة المباشرة يكتشف المسبار المعلم بالبيوتين بإضافة ستربت أفيدين المقترن مع الأنزيم وبعد ذلك التحضين مع المتفاعل المناسب. يمكن الحصول على تكبير أكثر للعلامة باستعمال الطريقة غير المباشرة والجسم المضاد للبيوتين أحادي النسيلة في الخطوة الأولى (3). يتبع ذلك بالجلوبيولين المناعي IgG للفئران المضاد المعامل بالبيوتين والذي يزيد من كمية البيوتين المرتبط مع المسبار. عندئذ يضاف ستربت أفيدين المقترن بالإنزيم والذي يرتبط بكل البيوتين المتاح مكبراً علامة الكشف الأنتيجيني.

استخدمت المسابير المعلمة بالديجوكسيجنين والمكتشفة بمضاد ديجوكسيجنين المقترن بإنزيم فوسفاتيز القاعدي أيضاً في نظام الكشف غير المباشر (29). طور نوع جديد من المسابير باستخدام الفلوريسين الذي يكتشف بواسطة مضاد الفلورسين المقترن بإنزيم الفوسفاتيز القاعدي. يعتقد أن الطريقة الأخيرة قد تقلل أكثر التفاعلات غير النوعية لأن الفلوروسين لا يوجد طبيعياً كمكون في نظام العائل (21).

ا ساسية والنوعية Sensitivity and Specificity

في حالة تنفيذ تقنية التهجين الموضعي النسيجي الكيميائي جيداً، يجب أن تكون نظاماً عالي الحساسية لكشف التتابعات النوعية للحمض النووي في قطاعات النسيج أو الشف النقطي. قد يتطلب بعض الوقت قبل أن تصبح هذه التقنية الجديدة طريقة روتينية في معظم معامل التشخيص. قد تكون حساسية هذه الطريقة بالمقارنة بالأنظمة الأخرى مثل الصبغ المناعي لبعض أنتيجينات الطيور مصدر تساؤل (1).

ا راجع References

1. Abbas, F., J. R. Andreasen, and M. W. Jackwood. Development of a polymerase chain reaction and a nonradioactive DNA probe for infectious laryngotracheitis virus. Avian Dis. 40:56-62. 1996.
2. Abdelmoumen, B. B., and R. S. Roy. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of avian mycoplasmas in culture. Avian Dis. 39:85-93. 1995.
3. Allan, G. M., J. A. Smyth, D. Todd, and M. S. McNulty. In situ hybridization for the detection of chicken anemia virus in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. Avian Dis. 37:177-182. 1993.
4. Barrett, J. T. Precipitation. In: Textbook of immunology: an introduction to immunochemistry and immunobiology, 5th ed. S. Bircher, ed., The C. V. Mosby Company, Washington, D.C. pp. 215-231. 1988.
5. Bhattacharjee, P. S., C. S. Naylor, and R. C. Jones. A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 23:471-480. 1994.
6. Cartum, R. C. Immunohistochemistry of infectious diseases. J. Histotechnol. 18:195-202. 1995.
7. Chen, B. Y., S. Host, T. Nunoya, and C. Itakura. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. Avian Pathol. 25:269-283. 1996.
8. Cruz-Coy, J. S., J. J. Giambrone, and F. J. Hoerr. Immunohistochemical detection of infectious bursal disease virus in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using monoclonal antibody. Avian Dis. 37:577-581. 1993.
9. Dea, S., and S. Garzon. Identification of coronaviruses by the use of indirect protein A-gold immunoelectron microscopy. J. Vet. Diagn. Invest. 3:297-305. 1991.
10. Fenner, F., P. Bachmann, E. Gibbs, F. Murphy, M. Studdert, and D. White. Laboratory diagnosis of viral diseases. In: Veterinary virology. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. pp. 237-264. 1987.
11. Fitzgerald, S. D., W. M. Reed, K. A. Langheinrich, A. S. Porter, and L. A. Lumbert. A retrospective immunohistochemical study of type II avian adeno viral infection in turkey, pheasant and chicken tissues. Avian Dis. 38:78-85. 1994.
12. Fitzgerald, S. D., and A. Richard. Comparison of four fixatives for routine splenic histology and immunohistochemical staining for group 11 avian adenovirus. Avian Dis. 39:425-431. 1995.
13. Haines, D. M., and B. J. Chelack. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. J. Vet. Diagn. Invest. 3:101-112. 1991.
14. Hammond, G. W., P. R. Hazelton, and I. Chuang. Improved detection of viruses by election microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimen. J. Clin. Microbiol. 14:210-221. 1981.
15. Hassan, M. K., Y. M. Saif, and S. S. Shawky. Comparison between antigen-capture ELISA and conventional methods used for titration of infectious and bursal disease virus. Avian Dis. 40:562-566. 1996.
16. Hayhow, C. S., and Y. M. Saif. Development of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of enterovirus in commercial turkeys. Avian Dis. 37:375-379. 1993.
17. Hooper, P. T., G. W. Russell, P. W. Selleck, and W. L. Stanislawek. Observations on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs. Avian Dis. 39:458-464. 1995.
18. Islam, M. R., and M. Khan. An immunocytochemical study on the sequential tissue distribution of duck plaque virus. Avian Pathol. 24:189-194. 1995.

19. Larsson, L.-I. Fixation and tissue pretreatment In: Immunocytochemistry: theory and practice. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. pp. 41-55. 1988.
20. Lockaby, S. B., F. J. Hoerr, A. C. Ellis, and M. S. Yu. Immunohistochemical detection of Newcastle disease virus in chickens. Avian Dis. 37:433-437. 1993.
21. Margraf, L. R., and D. Jennings-Siena. In-situ hybridization and molecular pathology for the histotechnician. In: Proceedings of the National Society for Histotechnology, Albuquerque, N. M. Workshop 71, pp. 1-30. 1996.
22. McNeilly, F., G. M. Allan, D. A. Moffett, and M. S. McNulty. Detection of chicken anemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase staining. Avian Pathol. 20:125-132. 1991.
23. McNulty, M. S., and G. M. Allan. Application of immunofluorescence in veterinary viral diagnosis. In: Recent advances in virus diagnosis. M. S. McNulty and J. B. McFerran, eds. Martinus Nijhoff, Dovdrecht, The Netherlands, pp. 15-26. 1986.
24. McNulty, M. S., W. L. Curran, D. Todd, and J. B. McFerran. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. Avian Pathol. 8:239-247. 1979.
25. Naqi, S. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. Avian Dis. 34:893-898. 1990.
26. Naqi, S. A., K. Karaca, and B. Bauman. A monoclonal antibody base antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. Avian Pathol. 22:555-564. 1993.
27. Nielsen, O. L., P. H. Jorgensen, M. Bisgaard, and S. Alexandersen. In situ hybridization for the detection of chicken anemia virus in experimentally-induced infection and field outbreaks. Avian Pathol. 24:149-155. 1995.
28. Oltishi, K., M. Senda, H. Yamamoto, H. Nagai, M. Norimatsu, and H. Sasaki. Detection of avian encephalomyelitis viral antigen with monoclonal antibody. Avian Pathol. 23:49-59. 1994.
29. Ramis, A., K. S. Latimer, F. D. Niagro, R. P. Campagnoli, B. W. Ritchie, and D. Pesti. Diagnosis of psitacine beak and feather disease (RBFD) viral infection, avian polyomavirus infection, adenovirus infection and herpesvirus infection in psitacine tissues using DNA in situ hybridization. Avian Pathol. 23:643-657. 1994.
30. Saif, L. S., Y. M. Saif, and K. W. Theil. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. Avian Dis. 29:798-811. 1985.
31. Shafren, D. R., and G. A. Tannock. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian encephalomyelitis virus antigens. Avian Dis. 32:209-214. 1988.
32. Smyth, J. A., D. A. Moffett, M. S. McNulty, D. Todd, and D. P. Mackie. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. Avian Dis. 37:324-328. 1993.
33. Snyder, D. B., D. P. Lana, P. K. Savage, F. S. Yancey, S. A. Mengel, and W. W. Marquardt. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis. 32:535-539. 1988.
34. Tanimura, N., K. Tsukamoto, K. Nakamura, M. Navita, and M. Maeda. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. Avian Dis. 39:9-20. 1995.
35. Thomas, C. B., and P. Sharp. Detection of antigenic variation among strains of Mycoplasma gallisepticum by enzyme-linked immunosorbent inhibition assay (ELISA) and western blot analysis. Avian Dis. 32:748-756. 1988.
36. Todd, D., J. L. Creelan, and M. S. McCoy. Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe. J. Clin. Microbiol. 29:933-939. 1991.
37. Toro, H., V. Godoy, J. Lavenas, E. Reyes, and E. F. Kaleta. Avian infectious bronchitis: viral persistence in harderian gland and histological changes after eyedrop vaccination. Avian Dis. 40:114-120. 1996.
38. Tsukamoto, K., T. Matsumura, M. Mase, and K. Imai. A highly sensitive, broad spectrum infectivity assay for infectious bursal disease virus. Avian Dis. 39:575-586. 1995.



الملاحق



الملحق الأول

ملحق للأمصال المضادة المرجعية والمحاليل التشخيصية الأخرى

APPENDIX TO REFERENCE ANTISERA AND OTHER DIAGNOSTIC REAGENTS

ا سبب ا رضي	ا واد ا ستخدمة	ا صدر	الترخيص (USDA)	تعليقات
ف وس الأدينو موعة ١	أنتيج / ف وس	Hy-vac, SPAFAS		موعة ١ ف وس أدينو الطيور النوع ١ (CELO) - 10
موعة ٢				انظر الالتهابات ا عوية ال فية / مرض الطحال ا رمري
موعة ٣ ف وسات أدينو (البط)	ف وس	ATCC		موعة ٣ ف وسات أدينو الطيور تتفاعل عكسياً مع أدينو الطيور ١٢٧ (ظاهرة ا فاض البيض) اختبارات منع تلازن الدم
(ف وسات أدينو الطيور ١٢٧ ا فاض البيض)	أنتيج	NVSL, SPAAFS		أنتيج تلازن الدم
ف وس الارتعاش الوبائي الط ي	أنتيج / ف وس	SPAFAS		
	الأمصال ا ضادة	NVSL, SPAAFS		
	كاشفات الإليزا	IDEXX, KPL	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	ف وس	ATCC, NVSL		

ف وس إنفلونزا الطيور	أنتيج / ف وس	NVSL, SPAAFS		
	الأمصال ا ضادة	Hy-Vac, NVSL, SPAFS		
	كاشفات الإليزا	KPL	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية النوع A
	كاشفات الإليزا	IDEXX	مرحله اختبار	الكشف على الأجسام ا ناعية (النوع إنفلونزا)
	ف وس	ATCC		الف وس النوع A ت النوعي للمجموعة A متاحة لاختبار الانتشار ا ناعي الأجار. يطلب مع الأجسام ا ناعية ا نشطة
ف وس ليكوزيس الطيور	الأمصال ا ضادة	SPAFS		
	كاشفات الإليزا	IDEXX	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	كاشفات الإليزا	IDEXX, KPL	نعم	الكشف على الأنتيج
	ف وس	ATCC		
ف وسات ريو الطيور (التهاب ا فاصل الف وسي)	أنتيج / ف وس	Hy-vac, SPAFAS		
	الأمصال ا ضادة	Hy-Vac, NVSL, SPAFAS		
	كاشفات الإليزا	IDEXX, KPL	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	ف وس	ATCC		الدجاج والرومي
	ف وس	NVSL		عترة فاهي كراو

بكت يا بورتديلا الطيور	الأمصال ا ضادة	جامعة مينيسوتا		د. ناجاراجا
	كاشفات الإليزا	KPL	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	أنتيج MAT	جامعة ولاية أوهايو		د. مد سيف
	أنتيج الطبق	جامعة مينسيوتا		د. ناجاراجا
ف وس أنيميا الدجاج	أنتيج / ف وس	Hy-vac, SPAFAS		
	الأمصال ا ضادة	Hy-vac, SPAFAS		
	كاشفات الإليزا	IDEXX	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	كاشفات الإليزا	IIetek		موعة اختبار الأجسام ا ناعية للجيلد هاي ف وس أنيميا الطيور
	كاشفات الإليزا	KPL	مرحلة اختبار	الكشف على الأجسام ا ناعية
متدثرة ببغائية	مسبب مرضي	ATCC		الثدييات، الطيور
	مسبب مرضي	NVSL		
	الأمصال ا ضادة	NVSL		الطيور
	أنتيج CF	NVSL		
	تلازن ا سم البدائي (EBA)	كلية ولاية TVMDL		د. لويد سنييد
	(DFA)	Dako		الكشف على الأنتيج لكل سلالات ا تدثرة: غ مرخص للاستخدام البيطري
	الإليزا	Abbott		الكشف على الأنتيج لكل سلالات ا تدثرة: غ مرخص للاستخدام البيطري
	مضاد مناعي للأجسام ا ناعية الفلوروسنا	NVSL		

التهاب أمعاء البط الف وسي	الأمصال ا ضادة مضاد مناعي للأجسام ا ناعية الفلوروسنـ ف وس ف وس	NVSL NVSL ATCC NVSL		تاج تصريح من USDA عترة لقاح
ف وس الالتهاب الكبدي للبط	ف وس	ATCC		
ف وس جدري الدجاج	أنتيج / ف وس الأمصال ا ضادة ف وس	Hy-Vac, SPAFAS Hy-Vac, SPAFAS ATCC		
ف وس الالتهاب الكبدي للإوز	ف وس	ATCC		تاج تصريح من USDA
مستديرة نظ ة الط ية	أنتيج الأمصال ا ضادة	Hy-Vac Hy-Vac		
ف وس الالتهابات ا عوية الـ فية (مرض الطحال ا رمري)	أنتيج / ف وس الأمصال ا ضادة الأمصال ا ضادة كاشفات الإليزا ف وس	SPAFAS SPAFAS جامعة مينيسوتا KPL ATCC	نعم	د. ناجاراجا الكشف على الأجسام ا ناعية

ف وس الالتهاب الشع ا عدي	أنتيج / ف وس	SPAFAS		
	الأمصال ا ضادة	NVSL, SPAFAS		
	كاشفات الإليزا	IDEXX, KPL	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	ف وس	ATCC, NVSL		عترات التصنيف ا صلي Mass, Conn, Ark99 متوفرة
	ف وس	NVSL		عترات ماس وبوديت متوفرة
ف وس مرض التهاب البـ سا	أنتيج	NVSL		أنتيج اختبار الانتشار ا ناعي الأجار
	أنتيج / ف وس	SPAFAS		
	الأمصال ا ضادة	SPAFAS, Hy-Vac, NVSL		
	كاشفات الإليزا	IDEXX	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	ف وس	NVSL		
	ف وس	ATCC		عترات التصنيف ا صلى D78, S40747 متوفرة
	ف وس	جامعة مينيسوتا		د. ج. ك. روزنبـ ج
ف وس التهاب ا نجرة والقصبة ا وائية	أنتيج / ف وس	SPAFAS		
	الأمصال ا ضادة	NVSL ,SPAFAS		مضاد مناعي للأجسام ا ناعية الفلوروسنـ (NVSL)
	كاشفات الإليزا	KPL	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	ف وس	ATCC, NVSL		

ف وس مرض ا اريك	أنتيج / ف وس	Hy-Vac, SPAFAS		
	الأمصال ا ضادة	Hy-Vac, SPAFAS		
	ف وس	ATCC		
	ف وس	ADOL		د. ريتشارد ويتر
مايكوبلازما جايسيبتيكم	الأمصال ا ضادة	SPAFAS		الأجسام ا صلية للدجاج
	الأمصال ا ضادة	NVSL		الأجسام ا صلية للدجاج و الرومي
	الأمصال ا ضادة	جامعة جورجيا		الأجسام ا صلية الضابطة – دجاج
	مسبار دي إن إيه	IDEXX	نعم	الكشف على الأنتيج
	كاشفات الإليزا	IDEXX, KPL	نعم	الكشف على الأجسام ا ناعية
	أنتيج تلازن الدم	جامعة مينسوتا		د. ناجاراجا
	أنتيج تلازن الدم	NVSL		
	أنتيج الطبق	Intervet	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية
	أنتيج الطبق	جامعة مينيسوتا		الكشف عن الأجسام ا ناعية
مايكوبلازما جايسيبتيكم / مايكوبلازما سينو	كاشفات الإليزا	IDEXX	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية (الدجاج)
مايكوبلازم ميلاجريديس	الأمصال ا ضادة	NVSL		الأجسام ا صلية للرومي
	كاشفات الإليزا	KPL	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية (الدجاج والرومي)
	أنتيج تلازن الدم	NVSL		
	أنتيج تلازن الدم	جامعة مينيسوتا		د. ناجاراجا
	أنتيج الطبق	Intervet, IGI/Vineland		الكشف عن الأجسام ا ناعية
	أنتيج الطبق	جامعة مينسوتا		د. ناجاراجا

مايكوبلازما سينو	الأمصال ا ضادة	NVSL, SPAFAS		الأجسام ا صلية للدجاج
	مسبار دي إن أيه	IDEXX	مرحلة اختبار	الكشف عن الأجسام الأنتيج
	كاشفات الإليزا	KPL	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية (الدجاج والرومي)
	أنتيج تلازن الدم	جامعة مينيسوتا		د. ناجاراجا
	أنتيج تلازن الدم	NVSL		
	أنتيج الطبق	Intervet		الكشف عن الأجسام ا ناعية
مرض النيوكاسل باراميكسو النوع ١	أنتيج / ف وس	NVSL, SPAFAS		
	الأمصال ا ضادة	NVSL, SPAFAS		
	كاشفات الإليزا	IDEXX	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية (كاشفات الدجاج والرومي)
	كاشفات الإليزا	KPL	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية (كاشفات الدجاج والرومي)
	ف وس	ATCC		بعض العترات تتطلب تصر أ من USDA
	ف وس	NVSL		لآسوتا، لا تاج إ تصريح
باراميكسو النوع ٢ (يكابيا)	الأمصال ا ضادة	NVSL, SPAFAS		
	أنتيج تلازن الدم	NVSL, SPAFAS		
	ف وس	ATCC, NVSL		
باراميكسو النوع ٣	الأمصال ا ضادة	NVSL, SPAFAS		لاختبار تلازن الدم / منع تلازن الدم
	أنتيج تلازن الدم	NVSL, SPAFAS		
	ف وس	NVSL		

باستريلا مالتوسيدا (كولا ا الطيور)	الأمصال ا ضادة كاشفات الإليزا مسبب مرضي	NVSL IDEXX, KPL NVSL	نعم	النوع ١، ٣-١٦ ففالكشف عن الأجسام ا ناعية النوع ١، ٣-١٦ فف النوع A - النوع E فف
ڤ وسات هربس الببغاوات	الأمصال ا ضادة مضاد مناعي للأجسام ا ناعية الفلوروسن ڤ وس	NVSL NVSL NVSL		
ڤ وس الالتهاب الشع ا عدي السمان	الأمصال ا ضادة ڤ وس	NVSL NVSL, SPAFAS		
ڤ وس ريتيكلوانوثيليوسيس	أنتيج أنتيج / ڤ وس الأمصال ا ضادة كاشفات الإليزا ڤ وس	Hy-Vac SPAFAS SPAFAS, Hy-Vac IDEXX ATCC	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية
سا ونيلا أريزونا	أنتيج MAT أنتيج الطبق أنتيج التجمع الأنبو	جامعة مينيسوتا جامعة مينيسوتا جامعة مينيسوتا		د. ناجاراجا د. ناجاراجا د. ناجاراجا
سا ونيلا إنتريتيديس	كاشفات الإليزا أنتيج التجمع الأنبو	IDEXX NVSL	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية

سا ونيلا باللورم	مصل مضاد	NVSL		
	مصل مضاد	جامعة مينيسوتا		
	أنتيج MAT	جامعة مينيسوتا		
	أنتيج الاختبار الدقيق	NVSL		
	أنتيج الطبق	Fort Dodge, IGI/Vineland	نعم	الكشف عن الأجسام ا ناعية
	أنتيج الطبق	جامعة مينيسوتا		د. ناجاراجا
	أنتيج التجمع الأنبو	جامعة مينيسوتا		د. ناجاراجا
سا ونيلا تايفيميوريوم	مصل مضاد	جامعة مينيسوتا		يقدم مع الأنتيج
	أنتيج MAT	جامعة مينيسوتا		
	أنتيج الطبق	جامعة مينيسوتا		
	أنتيج الاختبار الدقيق	جامعة مينيسوتا		د. ناجاراجا
سلالة السا ونيلا	BIND-Bacterial Ice Nucleation Detection	IDEXX	N/A	الكشف على الأنتيج
	Colony Lift	KPL	N/A	الكشف على الأنتيج
سا ونيلا موعة D	Colony Lift	KPL	N/A	الكشف على الأنتيج
سا ونيلا باللورم / جالين م	MAT		نعم	
سا ونيلا باللورم / جالين م	التجمع الطبقي	Fort Dodge	نعم	أنتيج متعدد التكافؤ
	التجمع الطبقي	IGI/Vineland	نعم	أنتيج متعدد التكافؤ
خا من ا سببات ا رضية	بيض الدجاج	SPAFAS, Hy-Vac		
		مزارع شروق الشمس		

الالتهابات ا عوية الرومي (العرف الأزرق)	ڤ وس ڤ وس	ATCC ATCC		انظر مرض ا اريك
ڤ وس الالتهاب الأنفي القص الرومي	كاشفات الإليزا	IDEXX		للأسواق الأوروبية فقط

الملحق الثاني

عناوين الذين يقومون بتوفير الأمصال المضادة المرجعية والمحاليل الأخرى

ADDRESSES OF SUPPLIERS OF REFERENCE ANTISERA AND OTHER REAGENTS

Abbott Laboratories
Diagnostics Division
Dept. 921, Bldg. APGC-6
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064
Phone: (800) 323-9100

Avian Disease & Oncology Lab.
Attn: Dr. Richard Witter
USDA-Agricultural Res. Service
3606 E. Mount Hope Rd.
East Lansing, MI 48823
Phone: (517) 337-6828
Fax: (517) 337-6776
E-mail: witterr@pilot.mus.edu

AmericanType Culture Collection
12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 20852-2600
Phone: (301) 881-2600
Fax: (301) 231-5826
E-mail: sales@atcc.org
http://www.atcc.org

Dako Corporation
6392 Via Real
Carpinteria, CA 93013
Phone: (800) 235-5673
Fax: (800) 566-DAKO
http://www.dakousa.com

Hy-Vac
2147 Highway 6, P.O. Box 285
Adel, IA 50003
Phone: (515) 993-3574, (800) 993-3574
Fax: (515) 993-5192

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, ME 04092
Phone: (207) 856-0300, (800) 932-4399
Fax: (207) 856-0346
http://www.idexx.com

IGI/Vineland Laboratories
2285 East Landis Ave.
Vineland, NJ 08360
Phone: (800) 225-0270, (609) 697-9711

Idetek, Inc.
1245 Reamwood Avenue
Sunnyvale, CA. 94089
Phone: (408) 745-0544

Intervet Incorporated
405 State St.
Millsboro, DE 19966-0318
Phone: (302) 934-8051, (800) 441-8272
Fax: (302) 934-4237

Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.
2 Cessna Court
Gaithersburg, MD 20879-4174
Phone: (301) 948-7755, (800) 638-3167
Fax: (301) 948-0169

National Veterinary Services Laboratory
Attention Reagents Office
Ames IA 50010
Phone: (515) 239-8571
Fax: (515) 239-8402
E-mail: Connie.J.Osmundson@usda.gov

Ohio State University
Attn: Dr. Y. M. Saif
OARDC/FAHRP
1680 Madison Ave.
Wooster OH 44691
Phone: (330) 263-3743
Fax: (330) 263-3677
E-mail: saif.l@osu.edu

Fort Dodge Animal Health
800 5th St. N.W.
Fort Dodge, IA 50501
Phone: (800) 685-5656
Fax: (800) 933-7252

SPAFAS, Inc.
67 Baxter Rd.
Storrs, CT 06268-1011
Phone: (860) 429-1990
Fax: (860) 429-8721

Sunrise Farms
175 Cauter Skill Road
Catskills, NY 12414
Phone: (518) 678-2292
Fax: (518) 678-2374

Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory (TVNDL)
Attn: Dr. L. Sneed
P. O. Drawer 3040
College Station, TX 77841
Phone: (409) 845-3414
Fax: (409) 845-1794

University of Delaware
Attn: Dr. Jack K. Rosenberg
Dept. of Animal & Food Sciences
College of Agriculture
Newark, DE 19717-1303
Phone:
Fax: (302) 831-8177
E-mail: john.rosenberg@mvc.udel.edu

University of Georgia
Attn: Dr. Stanley Kleven
Department of Avian Medicine
953 College Station Road
Athens, GA 30602-4875
Phone: (706) 542-5644
Fax: (706) 542-5630
E-mail: skleven@arches.uga.edu

University of Minnesota
Attn: Dr. K. V. Nagaraja
Dept. of Vet. Pathobiology
1971Commonwealth Ave.
301 Vet. Science building
St. Paul, MN 55108
Phone: (612) 625-9704
Fax: (612) 625-5203
E-mail: nagar001@maroon.tc.umn.edu

الملحق الثالث

إنـتـاج الأمصال المضادة والمحاليل الأخرى المتاحة

AVAILABLE CONTRACT ANTISERA AND OTHER REAGENTS PRODUCTION

Hy-Vac
2147 Highway 6, P.O. Box 285
Adel, IA 50003
Phone: (515) 993-5192, (800) 993-3574
Fax: (515) 993-5192

SPAFAS, Inc.
67 Baxter Rd.
Storrs, CT 06268-1011
Phone: (860) 429-1990
Fax: (860) 429-8721

Kestral, Inc.
3350 Ashworth Rd.
Waukee, IA 50263
Phone: (515) 987-5060
Fax: (515) 987-5037



الملحق الرابع

المكتب العالمي للمركز المرجعي للأمراض المشتركة

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES REFERENCE CENTERS

Highly Pathogenic Avian Influenza and Velogenic Newcastle Disease

Dennis J. Alexander
Central Veterinary Laboratory
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
UNITED KINGDOM
Telephone: (44-1932) 34-11-11
Fax: (44-1932) 34-99-83
E-mail: dalexander.vla@gtnet.gov.uk

Toni Della-Porta
CSIRO, Australian Animal Health Laboratory
Division of Animal Health
Institute of Animal Protection and Processing
Ryrie Street, P.O. Bag 24, Geelong, Victoria 3220
AUSTRALIA
Telephone: (61-52) 27-5000
Fax: (61-52) 27-5555

Erhard F. Kaleta
Institut fur Geflugelkrankheiten der Justus-Liebig-Universitat Giessen
Frankfurter Strasse 87, 35392 Giessen
GERMANY
Telephone: (49-641) 702-4865 or 4867
Fax: (49-641) 201548
E-mail: erhard.f.kaleta@vetmed.uni.giessen.de

B. Panigrahy
National Veterinary Services Laboratories
P.O> Box 844, Ames, Iowa 50010
U.S.A.
Telephone: (515) 239-8551
Fax: (515) 239-8348

Infectious Bursal Disease

Peter J. Wyeth
Central Veterinary Laboratory
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
UNITED KINGDOM
Telephone: (44-1932) 34-11-11
Fax: (44-1932) 34-99-83

B. Kouwebhoven
Animal Health Services West and Middle Holland
Regional Laboratory for Poultry Health
Arnsbergstraat 7, P.O. Box 9, 7400 AA Deventer
THE NETHERLANDS
Telephone: (31-570) 660-222
Fax: (31-570) 634-104

Marek's Disease

L. N. Payne
Institute for Animal Health, Compton Laboratory
Compton, Nr Newbury, Berkshire RG20 7NN
UNITED KINGDOM
Telephone: (44-1635) 57-84-11
Fax: (44-1635) 57-72-37

J. Lloyd Spencer
Agriculture and Agri-Food Canada
Animal Diseases Research Institute
3851 Fallowfield Road
P.O. Box 11300, Station H, Nepean, Ontario K2H 8P9
CANADA
Telephone: (613) 998-9320
Fax: (613) 954-0614

Mycoplasmosis

Stanley H. Kleven
Department of Avian Medicine
College of Veterinary Medicine
The University of Georgia
Athens, Georgia 30602-4875
U.S.A.
Telephone: (706) 542-1904
Fax: (706) 542-5630
E-mail: skleven@arches.uga.edu

Isabelle Kempf
CNEVA Ploufragan
Laboratoire central de recherches avicole et porcine
Unite de pathologie aviaire
Les Croix, BP 53, 22440 Ploufragan
FRANCE
Telephone: 33-(0) 2-96-76-01-29
Fax: 33-(0) 2-96-76-01-23

الملحق الخامس

جدول التشخيص المرجعي السريع
QUICK REFERENCE DIAGNOSTIC CHART

تم إعداد الملحق المرفق كمصدر مرجعي سريع للقائمين بالتشخيص لاختيار العينات والاختبارات لتشخيص الأمراض البكتيرية والفطرية والفيروسية. يشمل هذا المرجع الطرق باختصار لعزل وتعريف المسببات المرضية.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
الإصابة بميكروب بورديتيلا – بورديتيلا إفيوم	العزل؛ آجار ماكونكي: سالبة جرام، عصويات غير مخمرة، شكل المستعمرة، تلازن دم إيجابي، سالبة اختبار اليوريا.	– الاختبار المصلي: إليزا، اختبار التلازن الدقيق.	الأعراض المرضية النمطية والآفات التشريحية.
التسمم بسموم المطثية الوشيقية – المطثية الوشيقية	١– الافتراضي: شلل الطيور. ٢– التأكيدي: كشف وتصنيف السموم العصبية بالتحليل البيولوجي من الفأر.	– العزل من العينات الإكلينيكة والبيئية على وسط CMGS.	١– إليزا للكشف عن السموم العصبية. ٢– تفاعل البلمرة المتسلسل للسموم المطثية-الوشيقية.
الإصابة بالعطيفة – العطيفة المعوية، العطيفة الصائمة، عطيفة لاري	طرق المسح التجارية	العزل باستخدام الطرق الميكروبيولوجية التقليدية.	١– التصنيف المصلي. ٢– التقنيات الوبائية الجزيئية المتقدمة.
الإصابة بالمتدثرة – المتدثرة الببغائية	*العزل: ١– مزرعة الخلية، التأكيد بالتألق المناعي المباشر وغير المباشر. ٢– الحقن في كيس المح لجنين دجاج عمره ٦–٧ أيام والتأكيد بالنمو في مزرعة الخلية والصباغة. *الصبغة النسيجية الكيميائية المناعية للأنسجة أو مزرعة الخلية.	الفحص المصلي للعائل: ١– تثبيت المتمم. ٢– تلازن اللاتكس. ٣– تلازن الأجسام العضوية.	إذا وجدت أعراض المرض: ١– الإليزا – لكشف الإنتجين. ٢– صبغة الجمسا أو التألق المناعي غير المباشر لعينات مسح النسيج.
التسمم بالإيشريكية القولونية – الإيشريكية القولونية	العزل من الدم/الأعضاء من الحالات حديثة النفوق: ١– الافتراضي: مستعمرات وردية على آجار ماكونكي أو صفراء على آجار ثيرجيتول ٧. ٢– التأكيدي: عصويات سالبة جرام، سالبة أوكسيديز(حمض/حمض على TSI، موجبة إندول وتنتج غاز كبريتيد الهيدروجين).	الفحص المصلي للعائل غير مفيد.	١– التصنيف المصلي للمعزولات قد يكون مفيداً للوبائية. ٢– تحديد الضراوة – المعزولات الضارية: يقتل الحقن الصوص الصغير خلال ثلاثة أيام.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة – الأولية	الاختبارات التشخيصية المفضلة – الثانوية	الاختبارات البديلة والأخرى
الذائبة الاحمرارية – إريسيلوثيركس روزيوباثي	العزل على آجار الدم (٥-١٠% ثاني أكسيد الكربون)، منطقة ضيقة من تحلل الدم ألفا، عصويات موجبة جرام تنمو بعد ٢٤ ساعة، تنتج كبريتيد الهيدروجين على آجار تي إس آي.	١- المعزولات: سالبة مع إسكولين كتالاز، أوكسيداز، غير متحركة، لها نمو على شكل فُرشة الزجاجة، مميز على خط الوخز في الجيلاتين المغذي، تحدث أشكالاً متباينة من تخمر الكربوهيدرات. ٢- الفحص المصلي للعائل غير مفيد.	١- اختبار حماية الفئران: الحقن تحت الجلد أو في البريتون يقتل في ٦ أيام، تحدث الحماية مع مضادات المصل النوعية. ٢- تقييم الإمراضية: حقن الفأر عن طريق جلد الأذن المخدوش يقتل في ٦ أيام. ٣- التنمية في كيس المح من جنين دجاج عمره ٦-٨ أيام.
التهاب الجلد الغرغريني – المطثية الحاطمة النوع A، مطثية سيبتكم أو المكور العنقودي الذهبي	١- الافتراضي: الآفات العينية والمجهرية (أوديما، التهاب الجلد) في الجلد مع اشتراك العصويات أو المكورات موجبة جرام. ٢- التأكيدي: عزل المكور العنقودي الذهبي و/أو أنواع مطثيات.	اختبار التألق المناعي للبكتيريا النوعية من الآفات أو المزارع البكتيرية.	-
الزكام المعدي – مستدمية باراجالينيرم	العزل على الأوساط الصناعية: ١- الافتراضي: المعزولات المعتمدة على عامل النمو (فيما عدا المعزولات غير المعتمدة على عامل النمو أحياناً من جنوب أفريقيا) تكون سالبة كتاليز، سالبة جرام. ٢- التأكيدي: الاختبارات الكيميائية الحيوية.	الفحص المصلي للعائل: أختبار تلازن الدم باستخدام أنتجينات نوعية للثلاثة أنواع مصلية لـPage.	تفاعل البلمرة المتسلسل: إما على المستعمرات من أطباق العزل أو مباشرة على مسحات الجيوب الأنفية عند الفحص التشريحي.
التهاب الأغشية المصلية المعدي – رايميريلا أناتيبيستفر	العزل في وجود CO_2 على آجار الدم أو الصويا، عصويات قصيرة سالبة جرام، لا تنمو على آجار ماكونكي، موجبة أوكسيداز، سالبة إندول تتميز عن البكتيريا الأخرى بأشكال تخمر الكربوهيدرات (الجدول رقم ٤،١)، لا تخمر السكريات.	نادراً ما تستخدم الاختبارات المصلية لكشف الإصابة في العائل أو للتعرف على الميكروبات المزروعة.	التصنيف المصلي بالتلازن.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
الإصابة بالمطورة – مفطورة جاليسيبتكم، المفطورة السينوفية، مفطورة ميلياجريديس	الفحص المصلي للعائل: ١- الافتراضي: تلازن المصل الشريحي و/أو الأليزا. ٢- التأكيدي: اختبار منع تلازن الدم.	العزل والتعرف على الميكروب.	١- كشف المسبب: اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل. ٢- تعريف العترة: باستخدام تقنية رابد (تحليل الحمض النووي المختلف العشوائي).
متفطرة أيوي	عزل وتعريف العامل المسبب.		١- كشف المسبب: تفاعل البلمرة المتسلسل. ٢- تعريف العترة تقنية رابد.
كل أنواع المتفطرة الأخرى	عزل وتعريف العامل المسبب.		
الإصابة بالليستيريا – ليستيريا مونوسيتوجينيس	العزل على آجار الدم عند ٣٧ْم (٥-١٠% CO_2)، عصويات موجبة جرام (مزارع الشوربة ١٦-٢٤ ساعة)، الحركة عند ٢٥ْم، تحلل الدم بيتا على آجار الدم واختبار كامب مع المكور العنقودي الذهبي. التحلل المائي للأسكولين، إنتاج الحمض من رامينوز، لا يخمر زيلوز ومانيتول. موجبة مع كتالاز.	١- المعزولات تنمو عند ٤ْم. النمو على شكل شمسية في وسط الحركة عند (٢٥-٣٠ْم). التلوين الأزرق للمستعمرة على الأوساط الصافية مع الضوء المائل. ٢- اختبار آنتون: التهاب الملتحمة الصديدي عند حقن الأرنب عن طريق كيس الملتحمة.	١- العزل من كيس الألنتويس لجنين دجاج عمره ١٠ أيام. ٢- تهجين مسبار الحمض النووي دي إن إيه. ٣- تحليل الإنزيم المناعي.
الالتهاب المعوي النخري – المطثية الحاطمة الأنواع C و A	١- الافتراضي: الآفات العينية والمجهرية للنخر في المعي الصائم، اللفائفي بالاشتراك مع عصويات موجبة جرام. ٢- التأكيدي: عزل العترات السامة على أطباق آجار الدم المختزلة تحت ظروف لاهوائية.	تصنيف السموم بواسطة الاختبار البيولوجي في الفأر.	

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
الإصابة بالبكتيريا الأورنوثية – أورنيثوباكتيريم رينوتراكيال	العزل – آجار الدم: ١- سالب كتالاز، موجبة أوكسيداز، موجبة بيتا جلاكتوسيداز. ٢- اختبار API-ZYM، API-NFT.	الفحص المصلي للعائل: ١- الإليزا باستخدام أنتيجين المجموعة النوعي. ٢- تلازن الشريحة باستخدام أنتيجين المجموعة غير النوعي.	التصنيف المصلي للمعزولة – اختبار الترسيب في الآجار.
الإصــابو بالباســتيريلا – باستيريلا ملتوسيدا	العزل – آجار الدم أو نشا دكستروز، عصويات سالبة جرام قصيرة، لا تنمو على آجار ماكونكي، موجبة أوكسيداز، موجبة إندول. تتميز عن البكتيريا بشكل تخمر الكربوهيدرات (الجدول رقم ٤,١).	٢- نادراً ما تستخدم الاختبارات المصلية لكشف الإصابة في العائل أو لتعريف الميكروبات المزروعة. ٢- يستخدم الفحص المصلي لقياس الاستجابة للقاح.	١- يوجد خمس مجموعات محفظة: ***التعرف الافتراضي**: قرص انتشار إنــزيم الــسكريات العديدة المخاطية.***التعرف التأكيدي**: اختبار تلازن الدم غير المباشر. ٢- يوجد ١٦ نوعاً مصلياً جسمياً – اختبار الترسـيب في الآجار. ٣- الصباغة ثنائية القطب للخلايا البكتيرية من الأنسجة أو الإفرازات.
باستيريلا جالينيرم	مثل ما سبق باستثناء الأندول السالب	نادراً ما تستخدم الاختبارات المصلية لكشف الإصابة في العائل أو لتعريف الميكروب من المزرعة.	الصبغة ثنائية القطب للخلايا البكتيرية من الأنــسجة أو الإفرازات.
باستريلا هيموليتيكا	مثل ما سبق باستثناء الأندول سالب	نادراً ما تستخدم الاختبارات المصلية لكشف الإصابة في العائل أو لتعريف الميكروب من المزرعة.	منطقة من تحلل الدم بيتا حول المستعمرات على آجــار الدم.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة – الأولية	الاختبارات التشخيصية المفضلة – الثانوية	الاختبارات البديلة والأخرى
السل الكاذب – يارسينيا السل الكاذب	العزل على آجار الدم أو باترسون كوك، عصويات سالبة جرام، تنمو عادة على آجار ماكونكي، سالبة أوكسيداز وإندول، موجبة تحلل الجيلاتين. تتميز عن البكتيريا الأخرى بواسطة تخمر الكربوهيدرات (الجدول رقم ٤,١).	لا تستخدم الاختبارات المصلية لكشف الإصابة في العائل أو لتعريف الميكروب من المزرعة.	١- التصنيف المصلي: التلازن. ٢- الحركة عند ٢٥° م. ٣- الصبغة ثنائية القطب من الأنسجة أو الإفرازات.
الإصابة بالسالمونيلا – أنواع السالمونيلا	العزل من الأعضاء الداخلية المجموعة من الجهاز المعوي أو محتويات البيض. التعريف يتأكد بواسطة الفحص البيوكيميائي والمصلي.	العزل بالزرع من العينات البيئية أو التعريف المصلي للأجسام المضادة النوعية من العائل بواسطة اختبار التلازن باستخدام أنتيجين الخلية الكاملة.	١- إليزا للأجسام المضادة النوعية للعائل أو الجاذبة للأنتيجين. ٢- مسابير السالمونيلا باستخدام تتابعات أحماض نووية نوعية.
زهري الطيور المعوي – أنواع لولبيات سيربيولينا، اللولبيات غير المصنفة.	الأعراض المرضية مع العزل على آجار الدم باستخدام المضادات الحيوية والظروف اللاهوائية.	الأعراض المرضية مع اللولبيات في الطبقات أو القطاعات من الأمعاء الغليظة.	١- الفحص المصلي محدود القيمة؛ فقير الحساسية والنوعية (اختبار الترسيب). ٢- الاختبار البيوكيمائي – التقسيم.
الزهري الجهازي – بوريليا أنسرينا	رؤية اللولبيات في الدم (المركز في طبقة الخلايا البيضاء من الطيور المريضة). ١- الصبغة للمجهر الضوئي. ٢- نقطة معلقة للحقل المظلم.	العزل: ١- كيس المح لجنين الدجاج. ٢- حقن صيصان عمر يوم.	١- الفحص المصلي باستخدام اختبار الترسيب في الآجار والاختبارات الأخرى. ٢- الفحص النسيجي لقطاعات مصبوغة بصبغة الفضة من الكبد والطحال والكلى لرؤية اللوبيات.
الإصابة بالمكور العنقودي – المكور العنقودي الذهبي	التهاب المفاصل، التهاب العظام وأوتار الأربطة بالإضافة للعزل على آجار الدم. ١- مكورات موجب جرام منفردة أو في أزواج عنقودية. ٢- نمو غير مشروط. ٣- موجب كتالاز.	المعزولات تكون: ١- موجب كوأجيولاز. ٢- تحلل بيتا متباين عند ٢٤ ساعة. ٣- مستعمرات محاطة بهالة صفراء على آجار ملح المانيتول (مانيتول + استهلاك ١٠% من الملح).	حساسية لإنزيم ليزو ستافين.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة: الأولية	الاختبارات التشخيصية المفضلة: الثانوية	الاختبارات البديلة والأخرى
الإصابة بالمكور السبحي – المكور السبحزوابيديميكس	العزل على آجار الدم – مكورات سبحية موجبة جرام محللة للدم (بيتا) في أزواج أو سلاسل أو مفردة	سالبة كتلاز وتخمرالسوربيتول	١- تلازن اللاتكس. ٢- اختبار التألق المناعي.
المكور المعوي إفيوم **المكور المعوي ديورانز** **المكور المعوي البرازي** **المكور المعوي فيكيام**	العزل على آجار الدم، تحلل الدم ألفا/جاما، تنمو على آجار ماكونكي، موجبة جرام؛ خلايا كروية في أزواج أو سلاسل أو مفردة.	تنمو على أوساط إسكولين الصفراء. ١- المكور المعوي إفيوم يخمر سوربيتول وآرابينوز ومانيتول. ٢- المكور المعوي ديورانز لا تخمر مانيتول وسوربيتول وآرابينوز. ٣- المكور المعوي البرازي يخمر سوربيتول ومانيتول. ٤- المكور المعوي فيكيام يخمر مانيتول وآرابينوز.	
السل – المتفطرة الطيرية	الافتراضي: آفات عقدية متجبنة عديدة في الكبد والطحال وتجويف البطن. التأكيدي: ١- عصويات مقاومة للحمض من عينات الآفات أو قطاعات النسيج. ٢- العزل على صفار لونيشتين جينسين المجفف أو ميديل بروك 7H10.	١- التعريف: لاينتج نياسين، يحلل توين-٨٠ أو يختزل نيترات لكن لا يختزل تيلورايت. ٢- اختبارالسل: عند حقن البروتين المشتق من الميكروب في الدلايات يحدث انتفاخاً وزمياً بعد ٤٨ ساعة كاختبار إيجابي.	١- الفحص المصلي للعائل – الإليزا والتلازن. ٢- أختبارات الضراوة في الدجاج عمره ٤-٨ أسابيع.
الالتهاب المعوي التقرحي – مطثية كولينوم	١- الافتراضي: وجود مناطق نخرية عديدة وتقرح في الأمعاء الصغيرة والأعور. ٢- التأكيدي: العزل في وسط فوسفات تربتوز.	رؤية المطثيات بواسطة التألق المناعي.	١- اختبار الترسيب لكشف أنتيجين مطثية كولينوم من آفات الأمعاء. ٢- الفحص المصلي للعائل باستخدام اختبار تثبيت المتمم لكشف الطيور الحاملة للعدوى.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
الإصابة بالأسبرجلاس – أسبرجلاس فيوميجاتس	العزل على آجار سابارود دكستروز أو آجار بطاطس دكستروز عند ٢٧°م و ٣٧°م. ١- الافتراضي: الفحص بالمجهر الضوئي لعينة النسيج في ١٠% هيدروكسيد بوتاسيوم لاكتيفينول الأزرق ومشاهدة الخيوط الفطرية المقسمة المتفرعة، الأجناب المتوازية، العرض ٣-٦ ميكرون.	١- إعادة الزرع على وسط شابك Czapek's لتعريف المستعمرة والشكل المجهري. ٢- لا يفيد الفحص المصلي.	الآفات التشريحية والفحص النسيجي باستخدام صبغة جي إم إس.
الإصابة بالمبيضة البيضاء، أنواع المبيضة الأخرى	١- العزل على آجار سابارود مع ٥٠ ميكروجرام/مل كلورامفينيكول ٠,٠٩ مجم/مل من سيكلو هيكساميد عند ٢٧°م و ٣٧°م. ٢- الفحص بالمجهر الضوئي لعينة نسيج حديثة، موجبة الجرام، خمائر متبرعمة مستديرة إلى بيضاوية (٣-٧ ميكرون)، لها أفرع كاذبة.	١- إعادة الزرع على آجار طحين القمح مع ٠,٥% توين-٨٠ عند ٢٤°م لمدة ٧٢ساعة، الأبواغ المتدثرة مستديرة (١٠-١٥ ميكرون)، جدار مزدوج. ٢- احقن $١٠^{٥}$ – $١٠^{٦}$ خلية خميرة لكل ملليتر من مصل معقم وحضن عند ٣٧°م لمدة ١-٣ ساعات لتكوين أنبوبة الأنبات. ٣- تمثيل الكربوهيدرات في (API-20) (نظام تعريف الخمائر). ٤- لا يفيد الفحص المصلي.	الآفات العينية والفحص النسيجي بواسطة صبغة جي إم إس.
الإصابة بالداكتلاريا – داكتلاريا جالوبوفا	١- العزل على آجار سابارود مع ٥٠ ميكروجرام كلورامفينكول عند ٣٧°م أو ٤٥°م وتنتج المستعمرة صبغة حمراء منتشرة. ٢- الفحص المجهري: الخيوط الفطرية المقسمة، الغبيرات والغبيرة ثنائية الخلية البيضاوية.	لا يفيد الفحص المصلي.	الآفات العينية والفحص النسيجي، وجود الخيوط الفطرية داخل الآفات.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
القراع – بويغاء جاليني، بويغاء جيبسوم	١- العزل على آجار سابارود مع ٥٠ ميكروجرام/مل كلورامفينكول و٠,٥ مجم/مل سيكلوهيكسيد عند ٢٧ْ م، تنتج مستعمرة بويغاء جاليني صبغة حمراء منتشرة. ٢- الفحص المجهري لكحتات الجلد في ١٠% هيدروكسيد بوتاسيوم، خيوط فطرية متفرعة طويلة مقسمة من ٢-٥ ميكرون في العرض.	لا يفيد الفحص المصلي	الآفات المجهرية والفحص النسيجي باستخدام صبغة جي إم إس.
التسمم بالسموم الفطرية – أفلاتوكسين B1، B2، G1، G2، هي الأنواع الرئيسية	مستخلصات من الغذاء أو الحبوب المستخدمة، تحليل تي إل سي واختبار فلوروكوانت أفلاتوكسين، إليزا، اختبار أفلا-كب.	الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (إتش بي إل سي) (طريقة مرجعية)، جي سي – ماس سبكتروفوتوميتر، إذا كانت الطرق الأخرى غير كافية أو لها مشاكل.	الخمول، الكبد الشاحب، الانهيار المناعي، الأنيميا النزفية، يجب التعرف على سموم فطرية في أنسجة الجسم، السوائل أو الغذاء للتأكيد.
التسمم بسموم أوكرا – سموم أوكرا A هي النوع الأساسي	مستخلصات الغذاء والحبوب، تحليل تي إل سي.	إتش بي إل سي (الطريقة المرجعية) جي سي – ماس سبكتروفوتوميتر. في حالة عدم كفاية الاختبارات الأخرى أو في حالة وجود مشكلة.	زرق مائي مع ضعف وزيادة في الوزن، النخر الكلوي الحاد، التثبيط المناعي يجب أن يكون مصحوباً بوجود سموم أوكرا A في الغذاء أو الأنسجة. قد توجد نتائج الهدم والبناء لسموم أوكرا A في الأنسجة.
التسمم بالترايكو ثيسين – سموم C-T أو داي اسيتوكسي سكيربينول	مستخلص الحبوب والغذاء المستخدم، تحليل تي إل سي.	كروماتوجرافي الغاز (طريقة مرجعية)، تحليل جي سي – ماس سبكترو في حالة عدم كفاية أو مشاكل الطرق الأخرى.	آفات تجبنية، نخرية في تجويف الفم، نقص الوزن، دمار دهني وأنزفة في الأعضاء الداخلية خاصة الجهاز المعوي، تثبيط مناعي، يجب أن يكون مصحوباً بالسموم الفطرية في الحبوب أو الغذاء.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
التسمم بالديوكس نيفالينول – ديوكسي نيفالينول	مستخلص الغذاء أو الحبوب المستخدمة؛ تحليل تي إل سي؛ تحليل فلوروكوانت-دون؛ الإليزا.	إتش بي إل سي (طريقة مرجعية)؛ كروماتوجرافي الغاز؛ جي سي – ماس سبكترو في حالة عدم كفاية أو مشاكل الطرق الأخرى.	تظهر الطيور أنها مقاومة نسبياً لهذا السم الفطري لكن قد يحدث التثبيط المناعي ونقص الوزن، يجب أن يكون مصحوباً بالسموم الفطرية في الغذاء والحبوب.
التسمم بالجليوتوكسين	مستخلص الأنسجة المصابة، تحليل تي إل سي.	إتش بي إل سي، ماس – سبكترو يُستخدم لأغراض التأكيد.	التثبيط المناعي المتزامن مع الإصابة بالأسبرجلاس في الطيور. غير معروف إمكانية التعرف من الغذاء والحبوب المستهلكة بواسطة الدواجن. يجب التعرف على الجليوتوكسين في الأنسجة المصابة.
إصابات فيروس أدينو مجموعة ١ – فيروس أدينو مجموعه ١	١- العزل؛ خلايا الدجاج الرومي أو البط (المناظر) خلايا الكبد أو الكلى الجنينة من دجاج عمره ١-٤ أيام. 2- إليزا لكشف الجسم المضاد النوعي للمجموعة في دجاج خالي من الممرضات النوعية فقط.	١- كشف أنتيجين الفيروس في الأنسجة أو المزارع (المجهر الألكتروني المناعي، التألق المناعي، الأنزيم المناعي) أو المشاهدة المباشرة لفيروس الأدينو في المجهر الإلكتروني. ٢- التصنيف المصلي للمعزولات – يساعد قليلاً في تحديد الضراوة.	قد يساعد تحديد النوع الجيني مع تحديد الضراوة.
إصابات فيروس آربو – فيروس ألفا وفيروس فيلافي	العزل، حقن الفأر حديث الولادة عن طريق المخ، أجنة الدجاج عند عمر ٦-٨ أيام، الخلايا الليفية لأجنة الدجاج والبط، خلايا فيرو، خلايا BHK-21، RK-13. ١- فيروسات إعتلال الدماغ الخيلي الغربي، اعتلال الدماغ الخيلي الشرقي – التعرف بواسطة اختبار تثبيت المتمم. ٢- فيروسات EEE، WEE، HJ، TME بواسطة التألق المناعي. ٣- TME التعرف بواسطة تعادل الفيروس ومنع تلازن الدم.	الفحص المصلي للعائل – اختبار التعادل بتناقص البقع واختبار منع تلازن الدم.	١- إليزا – الفحص المصلي للعائل. ٢- تفاعل البلمرة المتسلسل – كشف الحمض النووي في البعوض والأنسجة.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة – الأولية	الاختبارات التشخيصية المفضلة – الثانوية	الاختبارات البديلة والأخرى
الارتعاش الوبائي أو التهاب الدماغ الطيري – فيروس بيكورنا	١– العزل على كيس المح في أجنة الدجاج عمر ٦ أيام. ٢– مجهر التألق المناعي.	الفحص المصلي للعائل. ١– تعادل الفيروس باستخدام عترة فان روكيل المتأقلمة على الجنين. ٢– اختبار قابلية الجنين للإصابة باستخدام بيض من قطيع مختبر وعترة فان روكيل من فيروس التهاب الدماغ الطيري. ٣– إليزا.	١– الفحص المصلي – اختبار الترسيب في الآجار على الأمصال المشتبهة. ٢– الفحص النسيجي المجهري على المخ، البنكرياس، المعدة الغدية.
إنفلونزا الطيور – النوع A لفيروس أورثوميكسو	العزل على كيس الألنتويس لجنين عمره ٩–١١ يوم: ١– الافتراضي: تلازن الدم إيجابي، لا يمنع بواسطة مضادات المصل لفيروس باراميكسو. ٢– التأكيدي: للمجموعة باختبار الترسيب في الآجار أو تحت النوع بكشف الأنتيجين (منع التلازن ومنع نيورامينيداز).	الفحص المصلي للعائل. ١– اختبار الترسيب باستخدام الأنتيجين النوعي للمجموعة للنوع A. ٢– التأكيد النوعي لتحت النوع بواسطة منع تلازن الدم ومنع نيورامينيداز.	١– إليزا: فحص مصلي للعائل، أنظمة كشف الأنتيجين. ٢– تحديد الضراوة: *اختبار الضراوة بالحقن الوريدي في دجاج عمره ٤–٨ أسابيع. *تفاعل البلمرة المتسلسل لتتابع موضع الانقسام H5، H7. ٣– اختبار التألق المناعي، الأنزيم المناعي على مسحات أو قطاعات نسيج – متخصص للنوع فقط.
مرض ليكوزيس الطيور – فيروس أونكورنا	العزل، خلايا مقاومة لتحت المجموعة E من فيروسات ليكوزيس الطيور: ١– توضيح أنتيجين فيروس ليكوزيس الطيور النوعي للمجموعة (P27) بواسطة إليزا. ٢– تحديد تحت المجموعة بواسطة تعادل الفيروس.	الفحص المصلي للعائل: ١– الإليزا المباشر. ٢– تعادل الفيروس لتحديد تحت المجموعة.	١– إليزا المباشر لأنتيجين (P27) على زلال البيض، مسحات مجمعية أو مهبلية؛ المتفاعلات الموجبة الكاذبة محتملة نتيجة الفيروس أو الجينات الداخلية. ٢– يكشف تفاعل البلمرة المتسلسل فيروسات ليكوزيس الخارجية (exogenous). ٣– دراسة الضراوة في دجاج قابل وراثياً خالي من الممرضات النوعية.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
التهاب الأنف والقصبة الهوائية في الطيور – الفيروس الرئوي	١- العزل : مزرعة عضو القصبة لأجنة الدجاج أو الرومي الخالية من المسببات المرضية: أ) تعطيل حركة الأهداب. ب) التعريف بالمجهر الإلكتروني النافذ. ج) التألق المناعي. ٢- تفاعل البلمرة المتسلسل.	الفحص المصلي للعائل: ١- الإليزا التقليدية والتنافسية. ٢- تعادل الفيروس باستخدام عترات متأقلمة على مزرعة الخلية. ٣- التألق المناعي غير المباشر.	١- العزل: *مزارع الأنسجة من خلايا أجنة الدجاج أو خلايا فيرو. *كيس المح لأجنة الدجاج الخالية من الممرضات النوعية. *الدجاج والرومي الخالي من الممرضات النوعية. ٢- تحليل البروتينات. ٣- كشف الأنتيجين في الأنسجة المثبتة باستخدام الإنزيم المناعي والإليزا. ٤- تفريق العترة باستخدام الأجسام المضادة الأحادية في اختبارات الإنزيم المناعي.
مرض المنقار والريش في الببغاوات – فيروس بوليوما	كشف الفيروس بواسطة مسبار الحمض DNA على المسحات المجمعية أو مسحات الطحال والكبد و الكلى.	العزل على خلايا العصافير الجنينة.	الفحص المصلي للعائل – اختبار تعادل الفيروس باستخدام فيروس متأقلم على خلايا الجنين الليفية.
مرض ديرزي – فيروس بارفو	١- العزل على كيس الألنتويس لأجنة الإوز أو البط المسكوفي عند عمر ١٠-١٥ يوم. ٢- العزل على مزارع الخلية المشتقة من أجنة الوز أو البط المسكوفي. ٣-تعريف المسبب بالمجهر الإلكتروني النافذ. ٤- تعادل الفيروس.	الفحص المصلي للعائل: ١- تعادل الفيروس على أمصال أو صفار البيض. ٢- اختبار الترسيب في الآجار. ٣-الإليزا. ٤- تناقص البقع.	١- كشف الأنتجين: *التألق المناعي غير المباشر. *الإنزيم المناعي. *اختبار الترسيب في الآجار. ٢- الفحص النسيجي على القلب والكبد والكلى. ٣- تهجين الأحماض النووية RNA وDNA. 4- تحليل القصر الإنزيمي الطرفي

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
الالتهاب المعوي الفيروسي في البط – فيروس هربس	العزل على الخلايا وحيدة الطبقة MDEF أو DEF: ١- الافتراضي: التأثير المرضي الخلوي. ٢- التأكيدي: اختبار التألق المناعي.	العزل، الحقن العضلي للبط المسكوفي عمر يوم. ١- الافتراضي: الموت في ٣-١٢ يوم مع قرح، بقع دفتيرية في الجهاز الهضمي ونزيف الأحشاء. ٢- التاكيدي: اختبارالتألق المناعي أو الحماية في البط المحصن عقب الإعداء بالمعزولة.	١- العزل: في بيض البط المسكوفي عن طريق الغشاء الكوريوآلانتويس: *الافتراضي: نفوق الجنين في ٤-١٠ أيام مع نزيف شديد. *التاكيدي: اختبارالتالق المناعي. ٢- الصباغة السالبة بالمجهر الإلكتروني النافذ لتوضح فيروس هربس لكنه ليس متخصصاً لفيروس الالتهاب المعوي فقط.
التهاب الكبد الفيروسي في البط– النوع ١ من فيروسات بيكورنا	العزل: الحقن تحت الجلد أو في العضل في البط عند عمر ١-٧ أيام. ١- الافتراضي: النفوق خلال ٢٤ ساعة.مع تضخم الطحال، الكبد مع أنزفة في الكلية. ٢- التأكيدي: عزل الفيروس من الكبد. ٣- التأكيدي: عدم نفوق البط المحصن سلبياً أو إيجابياً عند حقن الفيروس.	العزل على أجنة البط عن طريق الآلنتويس. ١- الافتراضي: نفوق في ٢٤-٧٢ ساعة مع تقزم، أنزفة تحت الجلد، وزمة في البطن والأطراق الخلفية. ٢- التأكيدي: يمنع المصل فائق المناعة للفيروس التأثير المرضي للمعزولة في الأجنة.	١- العزل من أجنة الدجاج. ٢- العزل على خلايا كبد أجنة البط والمصل المضاد للفيروس المخلوط مع المعزولة يمنع التأثير المرضي الخلوي.
النوع ٢ – الفيروس النجمي أو فيروس أسترو	العزل بالحقن تحت الجلد أو العضل للفيروس في البط عمر ١-٧ أيام. ١- الافتراضي: نفوق ٢٠% في ٢-٤ أيام مع آفات مشابهة للنوع ١. ٢- التأكيدي: الحماية التصالبية مع مضاد مصل النوع ٢.	العزل: من أجنة الدجاج أو البط عن طريق كيس المح. ١- الافتراضي: قد يحدث نفوق بعض الأجنة بعد ٤ تمريرات (غير دقيق). ٢- التاكيدي: اختبارات التعادل إذا كانت المعزولة مميتة للجنين.	مشاهدة جزيئات فيروس أستر النجمية في الكبد، الزرق عند الفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
النوع ٣ – فيروس بيكورنا	العزل، بالحق الوريدي أو العضلي للبط المعرض للأصابة عمر يوم. ١- الافتراضي: نفوق حتى ٢٠% في ٢-٤ أيام. ٢-التأكيدي: نفوق قليل (غير نوعي).	العزل على أجنة البط عن طريق الغشاء الكوريوآلانتويس ١- الافتراضي: يظهر الغشاء قشري وزمي خلال ٧-١٠ أيام. ٢- التأكيدي: التعادل بالمصل فائق المناعة المضاد لفيروس ٣.	اختبار التألق المناعي لخلايا كبد أجنة البط.
متلازمة انخفاض البيض ٧٦ – فيروس أدينو مجموعة ٣	الفحص المصلي للعائل، تلازن الدم إيجابي بعد إنتاج بيض غير طبيعي.	١- العزل على مزرعة الخلايا من قناة البيض من دجاج ينتج بيضاً غير طبيعي. ٢- معزولة الطيور المائية من الزرق.	تحليل القصر الإنزيمي الطرفي كوسيلة وبائية.
الإصابة بالفيروس المعوي – فيروس روتا	المجهر الإلكتروني المناعي، التصنيف بالتحليل الكهربي.	١- العزل على خلايا (MA140) مجموعة A. ٢- المجهر الإلكتروني النافذ المباشر.	الاختبار المصلي: إليزا، الترسيب في الآجار، المجهر الإلكتروني المناعي، تعادل الفيروس (مجموعة A).
الفيروس التاجي – فيروس كورونا	العزل على أجنة البيض، التأكيد باختبار التألق المناعي، تلازن الدم أو المجهر الإلكتروني المناعي.	اختبارات مصلية: التألق المناعي غير المباشر، تعادل الفيروس.	منع تلازن الدم
عامل متلازمة التقزم	العزل على أجنة البيض، التأكيد بالمجهر الالكتروني النافذ وتلازن الدم.	لا يوجد	لا يوجد
الفيروسات النجمية – فيروس أسترو	المجهر الإلكتروني المناعي.	لا يوجد	لا يوجد
الفيروسات المعوية	المجهر الإلكتروني المناعي.	العزل على بيض الأجنة	لا يوجد

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
الالتهاب المعوي النزفي في الرومي – فيروس أدينو مجموعة ٢	الانتشار المناعي في الآجار – أنسجة الطحال من طيور نافقة أو في مرحلة الموت.	الفحص المصلي – أمصال الطيور النافقة بواسطة اختبار الانتشار المناعي في الآجار أو الإليزا.	١- الفحص النسيجي المجهري – وجود احتوائيات نووية في الطحال والأمعاء وأقل تكراراً في الأنسجة الأخرى. ٢- التألق المناعي أو الإنزيم المناعي. ٣- إليزا الجاذبة للأنتيجين من الطحال. ٤- تفاعل البلمرة المتسلسل من نسيج الطحال.
فيروسات هربس للطيور الحرة وطيور الزينة	العزل على مزارع الخلية لأجنة الدجاج. ١- الافتراضي: لا يوجد تلازن دم، تأثير مرضي خلوي، من الممكن تكوين مدمجات خلوية قليلة، الحساسية للكلوروفورم. ومنع التكاثر بواسطة IDU. ٢- تأكيدي: اختبار التعادل.	الفحص المصلي للعائل – تعادل الفيروس في مزارع الخلية من أصل الطيور.	١- إليزا – للفحص المصلي وكشف الأنتيجين. ٢- تحديد الضراوة قد يجرى في أجنة بيض الدجاج. ٣- التألق المناعي المباشر على مسحات الأنسجة.
الأنيميا المعدية – فيروس سيركو	العزل: في دجاج خالي من الممرضات النوعية عمر يوم. ١- الافتراضي: أنيميا، ضمور الغدة التوتية عند ١٤ يوم. ٢- التاكيدي: التمرير الإضافي في الدجاج، كشف الفيروس.	الفحص المصلي للعائل – الإليزا	١- العزل على خلايا MDCC-MSB1. ٢-كشف أنتيجين الفيروس في المسحات، قطاعات النسيج بالصبغة المناعية. ٣- كشف الحمض النووي الفيروسي في الأنسجة بواسطة التهجين الموضعي والتهجين بالكشف النقطي أو اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل.
الالتهاب الشعبي المعدي – الفيروس التاجي (كورونا)	العزل على كيس الألنتويس لجنين الدجاج عمر ٩-١١ يوم. ١- الافتراضي: تقزم، التواء الجنين مع وجود أملاح حمض البوليك، تلازن الدم، الترسيب في الآجار لفيروسات أدينو وريو	الفحص المصلي: ١- إليزا (النوعي للمجموعة) يتعرف على الفيروس لكن ليس النوع المصلي. ٢- تعادل الفيروس ومنع تلازن الدم (النوعي للمجموعة)، الأمصال في الدجاج الصغير هي الأمثل. تحدث شائعاً التفاعلات التصالبية غير النوعية في الأمصال من الدجاج البياض والأمهات.	نتائج اختبار التحدي التصالبي في الدجاج هي أفضل دليل على المناعة التصالبية للقاحات المستخدمة ضد الإعداء بالمعزولة الحقلية.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
مرض البورصة المعدي – فيروس بيرنا	العزل: على الغشاء الكوريوالانتويس لجنين دجاج عمره ٩-١١ يوم. ١-الافتراضي: الأجنة التي بها آفات نمطية. ٢- التأكيدي: كشف الفيروس بواسطة اختبار الترسيب في الآجار، اختبارات التألق المناعي المباشرة وغير المباشرة، إليزا الجاذبة للأنتيجين، تفاعل البلمرة المتسلسل، النسخ العكسي.	الفحص المصلي: ١-الافتراضي: الإليزا. ٢- التأكيدي: اختبار الترسيب في الآجار أو تعادل الفيروس.	١- الفحص النسيجي المرضي: وجود آفات نمطية في بورصة المجمع. ٢- تفاعل البلمرة المتسلسل الناسخ العكسي، تحليل القصر الإنزيمي الطرفي لتعريف العترة. ٣- التعادل التصالبي في الأجنة. ٤- الإعداء التصالبي في الدجاج.
التهاب الحنجرة والقصبة الهوائية المعدي – فيروس ألفا هيربس	١- الآفات في الطيور المصابة: *الاحتوائيات النووية في قطاعات الأنسجة أو المسحات. *فيروس هربس عند الفحص بالمجهر الإلكتروالانتويس النافذ. ٢- العزل على الغشاء الكوريوني لأجنة دجاج عمرها ٩-١٢ يوم: *الافتراضي: وجود بقع على الغشاء. *التأكيدي: الاحتوائيات النووية من البقع أو فيروس هربس في المجهر الإلكتروني النافذ.	١- اختبار الضراوة في العائل: دجاج به أعراض مرضية وآفات قصبية. ٢- العزل: مزارع الخلية الطيرية: وجود التأثير المرضي الخلوي والبقع.	١- إليزا للفحص المصلي وكشف الأنتجين. ٢- اختبار الانتشار المناعي في الآجار. ٣- التألق المناعي غير المباشر / الإنزيم المناعي على قطاعات النسيج. ٤- تعادل الفيروس. ٥- DNA:RFLP: المسابير الجينية وتفاعل البلمرة المتسلسل.
مرض مارك – فيروس هربس	الآفات المميزة: أورام صلبة وآفات نمو ليمفاوي في الأنسجة والأعضاء: تتكون الآفات من تجمعات مختلفة من الخلايا وحيدة الخلية.	١- أنواع الخلية في الورم: غالباً خلايا (CD3+) بواسطة التألق المناعي غير المباشر. ٢- تفاعل البلمرة المتسلسل أو التهجين الموضعي على خلايا الورم: يوجد مجين فيروس مرض مارك.	١-عزل الفيروس في مزارع الخلية: مشاهدة التأثير المرضي الخلوي والتأكيد بواسطة التألق المناعي غير المباشر مع الأجسام المضادة النوعية. ٢- الجسم المضاد: الترسيب والإليزا لا يؤكدان كشف الفيروس أو الجسم المضاد ذاته لتشخيص مرض مارك.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
مرض الطحال المرمري في الفزان – فيروس أدينو مجموعة ٢	انظر الالتهاب المعوي النزفي في الرومي.	انظر الالتهاب المعوي النزفي في الرومي.	انظر الالتهاب المعوي النزفي في الرومي.
الإصابة بفيروس باراميكسو – باراميكسو النوع ١ (مرض نيوكاسل)	العزل: تجويف الألنتويس لأجنة الدجاج عمر ٩–١١ يوم، تلازن الدم موجب ومنع تلازن الدم بمضاد المصل النوعي.	الفحص المصلي للعائل اختبار منع تلازن الدم	١– إليزا (الفحص المصلي للعائل). ٢– تحديد الضراوة، اختبار الضراوة بالحقن في مخ صوص عمر يوم.
فيروس باراميكسو الأنواع ٢–٩	العزل: ١– على تجويف الآلنتويس لأجنة دجاج عمر ٩–١١ يوم، تلازن الدم موجب ويمنع بالمصل المضاد النوعي. ٢– حقن كيس المح في حالة النوع PMV-5.	الفحص المصلي للعائل اختبار منع تلازن الدم	إليزا (الفحص المصلي للعائل) لبعض أنواع فيروسات باراميكسو.
مرض الجدري – فيروسات الجدري	١– الآفات النوعية مع دليل فيروس الجدري: *الفحص الخلوي – الأجسام العنصرية. *فحص النسيج – الاحتوائيات السيتوبلازمة. *المجهر الإلكتروني النافذ. ٢– العزل على كيس كوريوآلانتويس لجنين دجاج عمر ٩–١٢ يوم. الافتراضي: وجود البقع على الغشاء. التأكيدي: الفحص النسيجي أو المجهر الإلكتروني النافذ.		
Psittacine Beak and Feather disease - *Circovirus*	الكشف عن الفيروس بمعيار DNA على خلايا كرات الدم البيضاء أو مسحات الريس.	الفحص المصلي للعائل: اختبار منع تلازن الدم باستخدام كرات حمراء من طائر الكوكاتو لكنها ذات قيمة ضئيلة في التعامل مع المرض في الطيور الفردية أو في الأعشاش.	التهجين الموضعي لكشف الفيروس.

المرض – الممرض	الاختبارات التشخيصية المفضلة		الاختبارات البديلة والأخرى
	الأولية	الثانوية	
ريتكلو إندوثيليوزيس فيروس أنكورنا	العزل، على مزرعة الخلايا الليفية لجنين دجاج خالي من الممرضات النوعية واختبار الخلايا للفيروس بواسطة إليزا، التألق المناعي غير المباشر، الإنزيم المناعي أو الانتشار المناعي في الآجار.	الفحص المصلي للعائل: ١- الإليزا المباشر. ٢- تعادل الفيروس. ٣- التألق المناعي غير المباشر. ٤- اختبار الترسيب في الآجار. ٥- تحديد تحت النوع باستخدام الأجسام المضادة أحادية النسيلة.	١- إليزا المباشر أو تثبيت المتمم لأنتيجين المجموعة (P30) في زلال البيض أو مسحات المجمع والمهبل. ٢- التألق المناعي غير المباشر، الترسيب للفحص المصلي للعائل وأنظمة كشف الأنتيجين. ٣- تفاعل البلمرة المتسلسل. ٤- اختبار الضراوة في دجاج خالي من الممرضات النوعية.
الالتهاب الكبدي الفيروسي للرومي – فيروس شبيه بفيروس بيكورنا	العزل على كيس المح والصباغة السالبة بالمجهر الإلكتروني النافذ للصفار في جنين الدجاج عمر ٥-٧ أيام.	الحقن البريتوني تحت الجلد أو العضلي للرومي عمر ١-٧ أيام بمعلق الكبد ٠,٢-٠,٥ مل أو سوائل المح من أجنة مصابة.	الفحص المجهري للكبد والبنكرياس مع الآفات التشريحية النمطية.
التهاب المفصل الفيروسي – فيروس ريو	العزل على كيس المح لجنين الدجاج عمره ٥-٧ أيام أو الغشاء الكوريوآلانتويس لجنين عمره ٩-١١ يوم أو مزرعة خلية كلية الدجاج الابتدائية. ١-الافتراضي: الأجنة مع الآفات والتغيرات الخلوية المرضية النمطية. ٢-التأكيدي: اختبار الانتشار المناعي في الآجار، التألق المناعي المباشر وغير المباشر.	الفحص المصلي: ١- الإليزا. ٢- الانتشار المناعي في الآجار وتعادل الفيروس.	١- الأعراض المرضية والآفات التشريحية. ٢- الفحص النسيجي، الآفات النمطية في المفاصل والأربطة.

الملحق السادس

فهرس المصادر

APPENDIX OF SOURCES

Aldrich Chemical Company
1001 West St. Paul Ave.
Milwaukee, Wisc. 53233
Phone: (414) 273-3850
Fax: (414) 273-4979
(800-962-9591)
E-mail: aldrich@sial.com
http://www.aldrich.sial.com/aldrich.html

Alpha Gamma Laboratories, Inc.
150 E. Montecito Avenue
Sierra Madre, Calif. 91024
Phone: (818) 355-3014

American Optical
Lieca, Inc.
111 Deer Lake Road
Deerfield,, Ill. 60015
Phone: (800) 248-0123
Fax: (847) 317-7268
E-mail: info@leicana.com
http://www.lieca.com

American Type Culture Collection
12301 Parklawn Drive
Rockville, Md. 20852
Fax: (301) 816-4379
E-mail: sales@atcc.org
http://www.atcc.org/general.html

Anchor Laboratories
2621 North Belt Highway
St. Joseph, Mo. 64506
Phone: (816) 233-1385
Fax: (816) 233-4767
http://www.boehringer-ingelheim.com

APHIS-Biologics
National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844
Ames, IA 50010

Avian and Wildlife Laboratory
University of Miami
1550 Northwest 10th Ave.
Miami, Fla. 33136
Phone: (800) 586-7390
Fax: (305) 243-5662

Barnstead|Thermolyne, Corp.
2555 Kerper Boulevard
Dubuque, Iowa
Phone: (800) 446-6060
Fax: (319) 589-0516
E-mail: barnstead@aol.com
http://www.barnsteadthermolyne.com

Baxter
One Baxter Parkway
Deerfield, Ill. 60015
Phone: (800) 422-9837

BDH Chemicals
Merck, Ltd.
Hunter Boulevard, Lutterworth
Leicestershire,
United Kingdom
Fax: +44 01455 558586

Beckman Instruments, Inc.
2500 Harbor Blvd
Fullerton, Calif. 92834-3100
Phone: (714) 871-4848
Fax: (714) 773-8898
http://www.beckman.com/

Becton Dickinson Microbiology Systems
7 Loveton Circle
Sparks, Md. 21030-0243
Phone: (800) 638-8663
http://www.bdms.com/index97.html

bioMérieux-Vitek, Inc.
595 Anglum Dr
Hazelwood, Mo. 63042-2395
Phone: (800) 638-4835
Fax: (314) 731-8528
E-mail: bmxvitek@vitek.com
http://www.biomerieux-vitek.com

BioRad
2000 Alfred Nobel Dr.
Hercules, Calif. 94547
Phone: (800) 424-6723

Bristol-Myers Squibb Co.
U. S. Pharmaceutical Company
P.O. Box 4500
Princeton, N.J. 08543
Phone: (800) 332-2056
http://www.bms.com/

Brownell Scientific
Rochester, N. Y. 14600

Calbiochem Corp.
P.O. Box 12087
San Diego, Calif. 92112-4180
Phone: (800) 854-3417
http://www.calbiochem.com/

Cambridge Naremco
1820 W. Mount Vernon St.
Springfield, Mo. 65801
Phone: (417) 866-4366

Carter, Rice, Storrs, & Bennett, Inc.
East Hartford, Conn. 06101

Clorox Company
1221 Broadway
Oakland, Calif. 94612
Phone: (510) 271-7000
E-mail: info@clorox.com
http://www.clorox.com/home.html

Cornell University, Duck Research Laboratory
P.O. Box 217
Eastport, N.Y. 11941
Phone: (516) 325-0600

Difco Laboratories
P.O. Box 331058
Detroit, Mich. 48232-7058
Phone: (313) 462-8500
(800-521-0851; 800-521-0851)
Fax: (313) 462-8517

Drummond Scientific Co.
500 Parkway
Broomall, Penn. 19008
Phone: (610) 353-0200

Electron Microscopy Sciences
321 Morris Road
Fort Washington, Penn. 19034
Phone: (215) 646-1566

Eli Lilly & Co.
Lilly Corporate Center
307E McCarthy Street
Indianapolis, Ind. 46285
Phone: (317) 276-9203
Fax: (317) 277-3354
http://www.lilly.com/usa/

Environmental Diagnostics
Div. of Granite Technological Enterprises
P.O. Box 908, 2990 Anthony Road
Burlington, N.C. 27215
Phone: (919) 226-6311

Escherichia coli Reference Center
Pennsylvania State University
105 Henning Building
University Park, Penn.
Phone: (814) 863-2167

Fisher Scientific Co.
711 Forbes Avenue
Pittsburgh, Penn. 15219
Phone: (800) 766-7000
Fax: (800) 926-1166
E-mail: webmaster@fisher1.com
http://www.fisher1.com/index.html

Gelman Sciences
P.O. Box 1448
600 South Wagner Road
Ann Arbor, Mich. 48103-9019
Phone: (800) 521-1520
http://www.pall.com/

Gene-Trak Systems
94 South Street
Hopkinton, Mass. 01748
Phone: (508) 435-8772
Fax: (508) 435-0025

GIBCO-BRL Laboratories
Life Technologies
8400 Helgerman Court
Gaithersburg, Md. 20887
Phone: (301) 670-4000
http://www.lifetech.com/

Grimaud Farms
1320-A South Aurora Street
Stockton, Calif. 95206
Phone: (209) 466-3200
Fax: (209) 466-8910

Guildhay Ltd.
6 Riverside Business Center
Walnut Tree Close, Guildford
Surrey GUI 4UG
United Kingdom
Phone: +44-1483-573727
Fax: +44-1483-574828

Hardwood Products Company
31 School Street
Guildford, Maine 04403
Phone: (800) 321-2313
Fax: (800) 323-4153
http://www.hwpuritan.com/

Hy-Vac
2147 Hwy 6, P.O. Box 285
Adel, Iowa 50003
Phone: (515) 993-5192
(800) 993-3574
Fax: (515) 993-5192

ICI
9 Millbank,
London SW1P 3JF
United Kingdom
Phone: (0171) 834 4444
http://www.ici.com/

ICN Biomedicals
ICN Pharmaceuticals, Inc.
3300 Hyland Ave.
Costa Mesa, Calif. 92626
Phone: (800) 854-0530
Fax: (800) 334-6999
http://www.icnpharm.com/

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Dr
Westbrook, Maine 04092
Phone: (207) 856-0300,
(800) 932-4399
Fax: (207) 856-0346
http://www.idexx.com/

Infectious Diseases Laboratory
College of Veterinary Medicine
University of Georgia
Athens, Ga. 30602
Fax: (706) 542-5233
E-mail: PA5@cak.vet.uga.edu

International Diagnostics Systems Corp.
2620 S. Cleveland Avenue
St. Joseph, Mich. 49085
Phone: (616) 428-8400

International Products Corp.
201 Connecticut Drive
Burlington, N.J. 08016
Phone: (609) 386-8770

Intervet America
405 State St
P.O. Box 318
Millsboro, Del. 19966-0318
Phone: (302) 934-8051,
(800) 441-8272
Fax: (302) 934-4237

Ivan Sorvall, Inc.
31 Picks Lane
Norwak, Conn. 06856
Phone: (203) 270-2299

Kirkegaard and Perry Laboratories
2 Cessna Court
Gaithersburg, Md. 20879
Phone: (301) 948-7755,
(800) 638-3167
Fax: (301) 948-0169

Lark Sequencing Technologies Inc.
9545 Katy Freeway, Suite 465
Houston, Tex. 77024
Phone: (713) 464-7488
Fax: (713) 464-7482
E-mail: larksales@aol.com
http://www.bio.com/companies/lar
k.html

Maine Biological Laboratories
P.O. Box 255
Waterville, Maine 04901
Phone: (207) 873-3989
Fax: (207) 873-4975

Microbial ID
125 Sandy Drive
Newark, Del. 19713
Phone: (302) 737-4297
Fax: (302) 737-7781

Millipore Corp.
80 Ashby Road
Bedford, Mass. 01730-2271
Phone: (800) 645-5476
Fax: (617) 275-5550
http://www.millipore.com/

Nasco, Inc.
901 Janesville Avenue
Fort Atkinson, Wisc. 53538
Phone: (414) 563-2446
Fax: (414) 563-8296

National Veterinary Services Laboratories (NVSL), APHIS
P.O. Box 844
Ames, Iowa 50010
Phone: (515) 239-8266
Fax: (515) 239-8397
http://www.aphis.usda.gov/vs/nvsl/
index.html

Neogen Coporation
620 Lesher Place
Lansing, Mich. 48912-1509
E-mail: NeogenCorp@aol.com
http://www.neogen.com/

Organon Corporation
Treyburn
100 Akzo Avenue
Durham N.C. 27712
Phone: (919) 620-2000
Fax: (919) 620-2107
http://www.akzonobel.com/ot/hom
e.html

Oxoid Ltd.
Distributed by **Unipath**
800 Proctor Ave.
Ogdensburg, N.Y. 13669
Phone: (800) 567-8378
Fax: (613) 226-3728

Parker Pen Co.
1400 N. Parker Dr.
Janesville, Wisc. 53647
Phone: (608) 755-7000

Penetone/West
74 Hudson Avenue
Tenafly, N.J. 07670
Phone: (201) 567-3000

Pharmacia Biotech, Inc.
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327
Piscataway, N.J. 08855
Phone: (800) 526-3593
Fax: (908) 457-0557
http://www.biotech.pharmacia.se/

Remel
12076 Santa Fe Trail
Lenexa, Kan. 66215
Phone: (913) 888-0939,
(800) 255-6730
Fax: (800) 234-0513,
(800) 621-8521

Romer Labs, Inc.
P.O. Box 2095
Washington, Missouri 63090
Phone: (314) 239-3009
Fax: (314) 239-2708

Sigma Chemical Company
P.O. Box 14508
St. Louis, Mo. 01730
Phone: (800) 325-3010
http://www.sigma.sial.com/

SPAFAS, Inc.
67 Baxter Road
Storrs, Conn. 06268-1011
Phone: (860) 429-1990
Fax: (860) 429-8721
http://www.criver.com/prodinfo/eg
lab.html

Sunrise Farms
175 Cauter Skill Road
Catskills, N.Y. 12414
Phone: (518) 678-2292
Fax: (518) 678-2374

Tetko, Inc.
4221 NE 34th Street
Kansas City, MO 64117
Phone: (800) 283-8182
Fax: (816) 452-2183
http://www.tetko.com/

Thomas Scientific
99 High Hill Road
Swedesboro, N.J. 08085-0099
Phone: (213) 688-0026

U. S. Dept. of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Microbiology Section CMI
240 Hennepin Avenue
Minneapolis, Minn. 55401-1999
Phone: (612) 334-4100
(612) 334-4134

Vector Laboratories, Inc.
30 Ingold Road
Burlingame, Calif. 94010
Phone: (800) 227-6666

Veterinary Diagnostic Technologies
4890 Van Gorden Street
Wheat Ridge, Colo. 80033
Phone: (303) 467-2741

Vicam LP
313 Pleasant Street
Watertown, Maine 02172
Phone: (800) 338-4381,
(617) 926-7045
Fax: (617) 923-8055
E-mail: vicam@vicam.com
http://www.vicam.com/

Vineland Laboratories
2285 E. Landis Ave.
Vineland, N.J. 08360
Phone: (609) 691-2411,
(800) 225-0270
Fax: (609) 691-1177

VMRD, Inc.
115 N.W. State Street
P.O. Box 502
Pullman, Wash. 99163
Phone: (800) 222-8673
Fax: (509) 332-5356
E-mail: vorder@vmrd.com
http://www,vmrd.com/

VWR Scientific Products
1310 Goshen Parkway
West Chester, Penn. 19380
Orders: (800) 932-5000
Web Orders: www.vwrsp.com
Phone: (610) 431-1700
Fax: (610) 429-9340
http://www.vwrsp.com/

ثبت المصطلحات

أولاً: عر – إ ليزي

أ

الا اد الأمريكي	American Association
أتربة	Dust
آجار	Agar
آجار اختبار القابلية	Susceptibility test agar
آجار ا ديد ثلاثي السكر	Triple sugar iron agar
آجار الدكستروز والنشا	Dextrose starch agar
آجار الدم ا عامل حرارياً	Chocolate blood agar
آجار الصويا	Trypticase soy agar
آجار حديد الليس	Lysine iron agar
آجار كولومبيا	Columbia CAN agar
آجار ملح ا انيتول	Mannitol-salt agar
أجسام إحتوائية داخل الأنوية	Intranuclear inclusions
أجنة البط	Duck embryos
أجنة الدجاج	Chicken embryos
احتياطات	Precautions
اختبار الأجسام ا ناعية ا تألقة (التألق ا ناعي)	Fluorescent antibody test
اختبار الانتشار ا ناعى الآجار	Agar gel immunodiffusion
اختبار الانتشار بالقرص	Disk diffusion test
اختبار التألق ا ناعي الإنز ي	Enzyme-linked fluorescent immunoassay

اختبار الترسيب الآجار	Agar gel precipitin (AGP) test
اختبار التلازن الدموي السل	Passive hemagglutination
اختبار الشر ة ا صلي السريع	Whole blood plate test
اختبار الضراوة با قن ا مع	Intracoloacal pathogenicity test
اختبار العامل ا سبب للمقاومة	Resistance-inducing factor test
اختبار تلازن اللاتكس	Latex agglutination
اختبار تنشيط ا لية غ ا نتجة	Non-producer cell activation test
اختبار خلط الأ اط الشكلية	Phenotypic mixing test (PM)
اختبارات تناقص البقع	Plaque reduction tests
اختزال التيللورايت	Tellurite reduction
اختزال النيترات	Nitrate reduction
اختزال بؤرة ف وس راوس ساركوما	Rous sarcoma virus-focus reduction
اختيار ا سبار	Probe selection
إدراك النمو	Recognition of growth
أد	Minimal
إزالة موعة كربوكسيل من ا مض الأمي لايس	Lysine decarboxylation
أساسي	Essential
أساسيات	Principles
استجابة	Response
استجابة عددية	Enumerative response
إشريكية قولونية	Escherichia coli
إصابات ف وس بوليوما	Polyomavirus infections
إصابة بالإنتان الدموي يكروب بوريليا	Septicemic borreliosis
إصابة بالإيشريشيا القولونية	Colibacillosis
إصابة بالباست يللا	Pasteurellosis
إصابة بالبكت يا الأنف قصبية الط ية	Ornithobacteriosis
إصابة بالداكتيلاريا	Dactylariosis

إصابة بالعطيفة	Campylobacteriosis
إصابة بالفطريات والتسمم الفطري	Mycoses and mycotoxicosis
إصابة باللولبيات (زهري الطيور)	Spirochetosis
إصابة با بيضة	Candidiasis
إصابة با تدثرة	Chlamydiosis
إصابة با كور العنقودي الذه	Staphylococcosis
إصابة بفطر الرشاشية	Aspergillosis
إصابة بف وس أدينو	Adenovirus infection
إصابة يكروب السا ونيلا	Salmonellosis
إصابة يكروب شبيه الواوي	Vibrio
إصابة يكروب ليست يا	Listeriosis
إصابة يكوبلازما	Mycoplasmosis
إصابة بف وس آربو	Arbovirus infection
أطباق دقيقة	Microplates
أطقم ارية	Commercial kit reagent
اعتلال البط الغر	Western duck sickness
أعراض	Signs
أغشية مصلية	Polysersitis
أغطية زجاجية	Coverslips
آفات تشر ية	Gross lesions
آفات عينية	Gross lesions
آفات هرية	Microscopic lesions
أقفاص العش	Nest boxes
إكلينيكي	Clinical
الإصابة با كور السبحي	Streptococcosis
التهاب الأغشية ا صلية ا عدي	Infectious serositis
التهاب الأنف والقصبة ا وائية الط ي	Avian rhinotracheitis

التهاب ا لد الغرغري	Gangrenous dermatitis
التهاب ا نجرة والقصبة ا وائية ا عدي	Infectious laryngotracheitis
التهاب الكبد الف وسي الرومي	Turkey virus hepatitis
التهاب ا خ السحائي الرومي	Turkey meningoencephalitis
التهاب ا خ الط ي (الارتعاش الوبائي)	Avian encephalomyelitis
التهاب ا فصل الف وسي	Viral arthritis
التهاب أمعاء البط الف وسي (طاعون البط)	Duck virus enteritis
التهاب شع معدي	Infectious bronchitis
التهاب غمد الأوتار	Tenosynovitis
التهاب كبدي البط	Duck hepatitis
التهاب معوي تقرحي	Ulcerative enteritis
التهاب معوي تنكرزي	Necrotic enteritis
التهاب معوي نز الرومي	Hemorrhagic enteritis of turkeys
التها معوي تقرحي	Ulcerative enteritis
الزمن	Time
ا تعرف عليها	Identified
إليزا	Enzyme-linked immunosorbent assays
إليزا تنافسية	Competitive ELISA
إليزا جاذبة ا ستضد	AC-ELISA
أمان ا عمل	Laboratory safety
أمراض ا طثيات (الكلوستريديوم)	Clostridial diseases
إمراضية	Pathogenicity
أمصال	Sera
إنتاج النياسـ	Niacin production
الإنتان الدموي يكروب بوريليا	Septicemic borreliosis
الانتشار ا ناعي ا زدوج	Double-immunodiffusion
أنتيجـ ـفـ وسي	Viral antigen

أنز أكسيديز	Oxidase
إنز التحلل ا ائي للأرجن	Arginine dihydrolase
إنز ب وكسيديز ا ناعي	Immunoperoxidase
إنز لل اليوريا	Urease
إنسان	Human
أنظمة كشف مولد الضد (الأنتيج)	Antigen detection systems
إنفلونزا الطيور	Avian influenza
أنواع التأث ات الإمراضية	Types of infectivity assays
أنواع رضة	Pathotypes
أ ية	Significance
أورام	Tumors
أوساط	Media
أوساط الزرع	Culture media
أوساط الزرع	Planting media
أوساط حاملة	Holding media
أوساط غ ا نتقاة	Non-selective media
أو	Initial

ب

بؤرة	Focus
بادئ عشي	Nested primer
باست يللا ا للة للدم	Pasteurella haemolytica
ببتيدات نشوية	Glycopeptides
ببغاوات	Budgerigars
بروت التلاحم أو الاندماج	Fusion protein
بروتينات نشوية	Glycoproteins
بقع معتمة	Opaque plaques
بكت يا غ مصاحبة	Nonsatellitic bacteria

بكت يا مصاحبة	Satellitic bacteria
بكت يا الط ية الأنف قصبية	Ornithobacterium rhinotracheale (ORT)
بكت يا بوردتيلا الطيور	Bordetella avium
بكت يا معوية	Enterobacter
بكت يا وميكوبلازما	Bacteria and mycoplasma
بيئات منتقاة	Selective media
بيئية	Environmental
بيان لو وذجي للغاز	Typical gas chromatogram
بيوت الأقفاص	Cage housing
بيوكيميائي	Biochemical

ت

تأث مرضي خلوي	Cytopathic effect
تأث مكا	Prozone
تأكيد	Confirmation
تألق مناعي	Fluorescent-antibody
تباين العترة	Strain variation
تتابع ا مض النووي	Nucleic acid sequencing
تثبيت ا تمم	Complement fixation
فيد	Lyophilyzation
لط إنز ي	Coagulase
ميد ا لايا	Freezing of cells
ت عائلة ألفا ه بس	Alpha herps virinae
ت نوعي	Subtype
ديد الضراوة	Pathogenicity determination
ض الأنتيج	Antigen preparation
ض الأنتيج ا ثبط لتلازن الدم	Preparation of HI antigen
ض	Incubation

لل ا يبيورات	Hippurate hydrolysis
لل توين-٨٠	Tween-80 hydrolysis
لل دي إن إيه	DNA hydrolysis
ليل القصر الإنز ي الطر	Restriction endonuclease
ليل القطع الإنز ي للحامض النووي	Restriction endonuclease analysis
ليل كمي	Quantal assays
ليل مناعي	Immunoassay
فيفات	Dilutions
تداول	Handling
تدوين	Archiving
ترسيب ا لام	Gell-precipitin
ترشيح	Filtration
تسجيل	Reporting
تسمم بالأفلاتوكس	Aflatoxicosis
تسمم بالأوكراتوكس	Ochratoxicosis
تسمم بالترايكوثيس	Trichothecene
تسمم طثية بوتيلنيوم	Botulism
تسمم دموي البط	Duck septicemia
تسمم دموي قولو	Colisepticaemia
تسمم فطري	Mycotoxicoses
تشخيص معملي	Laboratory diagnosis
تصنيف ا بواسطة الفصل الكهربائي	Genome electrophero typing
تصنيف ا صلي	Serological typing
تصنيف ريبوزي	Ripotyping
تصنيف مصلي	Serotyping
تضخم الطحال	Splenomegally
تطه	Decontamination

تعادل ف وسي	Virus neutralization
تعدد طول القطعة القصري	Restriction fragment length polymorphism
تعريف	Identification
تعقيم	Sterilization
تفاعل البلمرة ا تسلسل	Polymerase chain reaction
تفاعل البلمرة بالبداية الساخنة	Hot-start PCR
تفاعل أوكسيديز	Oxidase reaction
تفاعلات ملتفة	Rolling reactions
تفاوت طول القطع الوراثية	Restriction fragment length polymorphism
تفريق	Differentiation
تفس	Interpreting
تقد	Preface
تقسيم	Classification
تقسيم	Taxonomy
تقنيات	Techniques
تقنيات مزرعة ا لية علم الف وسات	Cell-culture techniques in virology
تقنيات مناعية	Immunological techniques
تقنية الفرد الطبقي الناسخ	Replica plating
تقييم	Evaluation
تقييم وتفس	Interpretation
تقييم جزيئي للضراوة	Molecular assessment of pathogenicity
تكاثر الف وس أجنة البيض	Virus propagation in embryonating eggs
تكوين البقع	Plaque formation
تلازن ا سم البدائي	Elementary body agglutination
تلوث سطح الطبق	Plate surface contamination
اثل الكابسيد النووي	Symmetry of the nucleocapsid
رير مزارع ا لية	Passage of cell cultures

تنافسية	Competitive
جـ ا امض النووي الديوكسي ريبوزي	DNA-DNA hypridization
جـ اللطخ النقطي	Dot-blot hyperdization
جـ موضعي نسيجي	In situ hyperdization
توقيفية	Blocking

ث

ثبات حراري	Thermal stability

ج

جذب الأنتيجـ	Antigen capture
جزيئات شبيهة الفـ وس ا عوي	Enterovirus-like particle
جسم مضاد أو جاذب	Primary capture antibody
ع	Collection
ع الغشاء الكوريو السقائي	Harvesting the CAM
جنس فطرى مغز	Fusarium

ح

حالات	Cases
حديد ثلاثي السكر	Triple sugar iron
حركة	Motility
حساب ا عيار	Calculation of titers
حساسية	Sensitivity
حساسية ـض النالاديكس	Nalidixic acid sensitivity
حفظ	Storage
حقن الدجاج	Chicken inoculation
حقن الغشاء الكوريوالانتويس	Chorioallantoic membrane inoculation
حقن الكيس الأمي	Amniotic sac inoculation
حقن الكيس السقائي	Allanotic sac inoculations
حقن جني	Embryo inoculation

حقن حيوانات التجارب	Animal inoculation
حقن داخل ا خ	Intracerebral inoculation
حقن كيس ا ح	Yolk sac inoculation
حليب عباد الشمس	Litmus milk
ض نووي	Nucleic acid
ض نووي دي إن إيه متعدد الأشكال	Polymorphic DNA analysis
حوصلة القصية	Sternal bursa
حي	Biopsy

خ

خصائص	Features
خطوات	Steps
خطورة	Hazards
خلايا أمعاء الطيور	Avian intestinal cells
خلفية	Background
خلية	Cell

د

دراسات الإعداء التصالبية	Cross challenge studies
درجات ا رارة	Temperatures
دهون أساسية	Essential lipid
دهون عديدة السكريات السطحية	Surface lipopolysaccarides
ذئبة راء	Erysipelas

ر

را يلا أناتيبستفر	Riemerella anatipestifer
ربط أنتيجي	Antigen binding
رتبة اللولبيات	Spirochaetales
رشاشية متبخرة	Aspergillus fumigatus
رصد	Monitoring

رصد بيئي	Environmental monitoring
رقبة رخوة	Limber neck
ريتيكلوإندوثيليوسيس (شباك بطاني)	Reticuloendotheliosis

ز

زراعة البيض	Egg culture
زرع بيض الأجنة	Culture in embryonating eggs
زرع نسيجي	Tissue culture
زكام معدي	Infectious coryza
زلال البيض	Albumin
زلال اللاكتوز ا تحلل	Lactoalbumin hydrolysate
زهري معوي	Avian intestinal spirochetes

س

سا ونيلا	Salmonella
سا ونيلا الط ية	Salmonella gallinarum
سا ونيلا انتريتيدس	Salmonella enteritidis
سا ونيلا بللورم	Salmonella pullorum
سريع	Rapid
سعف أو قراع	Ringworm (favus)
سقوط الريش	French molt
سلفا ب يدين	Sulfapyridine
سلفا ديازين	Sulfadiazine
وم جليوتوكس الفطرية ا ثبطة للمناعة	Gliotoxin
وم خلوية	Cytotoxins
سيطرة و ص	Control and vaccination

ش

شحن	Shipping
شعروية ط ية	Trichophyton gallinae

شف جي شرقي	Souther blot hybridization
شوربة	Broths
شوربة فوسفات التربتوز	Tryptose phosphate broth (TPB)

ص

صبغ	Staining
صبغ نسيجي مناعي	Immunohistologic Staining
صبغات الصمود ا مضي	Acid fast smears
صبغة سافران	Safranin
صبغة فلوروكروم	Fluorochrome stain
صبغة كلوريد نيوتترازوليم	Neotetrazolium
صبغة كوماسي الزرقاء	Coomassiebrilliant blue R
صفات	Characteristics
صيصان فاقسة	Hatchings

ض

ضعف الامتصاص	Malabsorption

ط

طرق ا قن	Routes of inoculation
طريقة النسخ العكسي	Reverse transcriptase
طلب اللقاح	Vaccine delivery
طيور الزينة من غ البغاوات	Nonbudgerigar psittacine birds
طيور كاشفة	Sentinel birds

ع

عائل	Host
عائلة الف وسات التاجية	Coronaviridae
عائلة ف وسات ا دري	Poxviridae
عائلة ف وسات بابوفا	Papovaviridae
عائلة ه بس	Herpesviridae

English	العربية
Chicken anemia agent	عامل أنيميا الدجاج
Stunting syndrome agent (SSA)	عامل متلازمة التقزم
Vaccine strains	عترات اللقاح
P. multocida infection	عدوى الباست يللا ملتوسيدا
P. gallinarum infection	عدوى باست يللا جلين م الطيور
Pseudotuberculosis	عدوى السل الكاذب
Mucopolysaccharides	عديد السكريات ا خاطية
Asymptomatic	عد الأعراض
Swollen head syndrome	عرض التورم الوجهي
Carpodacus mexicanus	عصاف ا ل
Tracheal organ	عضو القصبة ا وائية
Avian campylobacters	عطيفة الطيور
Campylobacter fetus	عطيفة جنينية
Campylobacter jejuni	عطيفة صامدة
Campylobacter coli	عطيفة قولونية
Campylobacter lari	عطيفة لاري
Herring bone	عظام ك الر ة
Feed	عليقة
One-day-old	عمر يوم
Pipetting	عملية ا ص
Samples	عينات
Specimens	عينات

غ

English	العربية
Thymus	غدة توتية
Rationale for using	غرض الاستخدام

ف

English	العربية
Histopathology	فحص نسيجي مرضي

فراخ البط أو البط الصغ	Ducklings
فرشة الأرضية	Floor litter
فرط الدم ا نفعل	Passive hyperemia
فصل كهر للإنز عديد ا واقع	multilocus enzyme electrophoresis
فصل مناعي قطري	Radial immuno diffusion
فطر ا م ة البيضاء	Candida albicans
فطر الرشاشيات	Aspergillas
فطر داكتيلاريا جالوبافا ا ب للحرارة	Dactylaria gallopava
فقاقيع	Bubbles
فقر ا لايا الأمية للدم	Aplastic anemia
فوكس قاعدي	Basic fuchsin
ف وس الالتهاب الأنف قص الرومي	Turkey rhinotracheitis
ف وس الغدة النكافية	Mumps virus
ف وس ألفا ه بس	Alpha herpes virus
ف وس أنيميا الدجاج	Chicken anemia virus (CAV)
ف وس بكت ي	Phage typing
ف وس حر أو غ مرتبط با لية	Cell-free virus
ف وس رئوي	Respiratory syncytialvirus
ف وس رئوي	Pnemovirus
ف وس روتا	Rota virus
ف وس عا الضراوة	Velogenic virus
ف وس قليل الضراوة	Lentogenic virus
ف وس متلازمة ا فاض البيض	EDS 76 virus
ف وس متوسط الضراوة	Mesogenic virus
ف وس مرتبط با لية	Cell-associated virus
ف وس مرض النيوكاسيل	Newcastle disease virus
ف وس نظ الإنفلونزا الإنسان	Human parainfluenza virus

ف وسات باراميكسو الطيور	Avian paramyxoviruses
ف وسات بارفو ا صاحبة للأدينو	Adenovirus-associated paroviruses
ف وسات بيكورنا	Picorna viruses
ف وسات تاجية	Coronaviruses
ف وسات جدري الطيور	Avipoxvirus
ف وسات ريو	Reoviruses
ف وسات سرطانية	Oncorna viruses
ف وسات كورونا	Coronaviruses
ف وسات معوية	Enteric viruses
ف وسات معوية	Enteroviruses
ف وسات معوية صغ ة	Small enteric viruses
ف وسات مية	Astroviruses
ف وسات ه بس الطيور الطليقة وا لية	Herpesvirus of free-living and pet birds
ف وس الالتهاب الكبدي النوع الأول	Duck hepatitis virus type I
ف وس الالتهاب الكبدي النوع الثا	Duck hepatitis virus type II
ف وس الالتهاب الكبدي النوع الثالث	Duck hepatitis virus type III
ف وس بارفو الإوز (مرض ديرزي)	Goose parvovirus (Derzsy's disease)
ف وسات التهاب ا خ ا يلي الشرقي	Eastern equine encephalitis

ق

قابلية جن الدجاج للإصابة	Chicken embryo susceptibility
قراد ا من جنس أرجاس	Argas persicus
قراد ا من جنس أرجاس	Argas sanchezi
قراد ا من جنس أرجاس	Argas arboreus
قطاعات البارا	Paraffin sections
قطر الف وس	Diameter of the virion
قطع اللحم مع ا لوكوز والنشا	Chopped meat-glucose-starch
قطعان الدواجن	Poultry flocks

قياس تكوين البقع	Plaques assay
قيمة أو مستوى خلايا الدم ا مراء	hematocrite value

ك

كاشف ننهيدرين	Ninhydrin reagent
كشف	Detection
كشف أنتيج ڤ وس إنفلونزا الطيور	Detect AIV antigen
كمية	Quantitative
كيفية	Qualitative
كيمياء الأنسجة ا ناعية	Immunohistochemistry

ل

لقاح ڤ وس ميت	Killed-virus vaccine
ليكوسيس الطيور	Avian leukosis
ليكوسيس/ساركوما (تكثر نسيج البيض)	Leukosis/Sarcomas

م

ما قبل ا غذية	Pre-enrichment
مبيضة استوائية	Candida tropicalis
متخصصي أمراض الطيور	Avian pathologests
متدثرة ببغائية	Chlamydia psittaci
متطلبات النمو	Growth requirements
متفاعلات	Reactors
متفطرة ط ية	Mycobacterium avium
متلازمة الالتهاب ا عوي والنفوق الرومي	Pout enteritis mortality syndrome
متلازمة الرأس ا نتفخ	Swollen head syndrome
متلازمة النفوق الشوكي	Spiking mortality
متلازمة أناتيبستفر	Anatipestifer syndrome
متوسط زمن النفوق	Mean death time
متوسط هندسي	Geometric mean

Transmission electron microscopy — هر إلكترو النافذ
Immune electron microscopy (IEM) — هر إلكترو مناعي
Balanced salt solutions (BSS_s) — اليل ا لح ا تزنة
Trypsin and versene (TV) solution — لول التربس والف س
Neutral red solution — لول ا تعادل الأ ر
Antibiotic solution — لول ا ضاد ا يوي
Glycerol saline — لول ا لح ا ضاف إليه ا لسرول
Phosphate-buffered saline (PBS) — لول ملح الفوسفات ا نظم
Supplemended — مدعم
Giant cell syncytia — مدمج خلايا عملاقة
Solvent — مذيب
Visual — مرئي
References — مراجع
Quality control — مراقبة ا ودة
Disease — مرض
Budgerigar fledgling disease — مرض أفراخ الببغاوات
New duck disease — مرض البط ا ديد
Infectious bursal disease — مرض البـ سا ا عدي
Pox — مرض ا دري
Tuberculosis — مرض السل
Quail disease — مرض السمان
Marble spleen disease of pheasants — مرض الطحال ا رمري الفزان
Psittacine beak and feather disease — مرض ا نقار والريش البغاوات
Marek's disease (MD) — مرض مارك
Newcasle disease — مرض نيوكاسيل
Lymphocyte cultures — مزارع ا لية الليمفاوية
Chick embryo kidney (CEK) cell culture — مزارع خلية كلية أجنة الدجاج

مزارع خلية كلية الدجاج	Chicken kidneys (CK) cell culture
مزرعة الأنسجة العضوية	Organ tissue culture
مساب الأ اض النووية	Nucleic acid probes
مسبار ا امض النووي دي إن إيه	DNA probe hybridization
مسبب لالتهاب العيون الفي ي	Fibrinoheterophillic blepharitis
مسبب مرضي	Agent
مسببات مرضية قريبة الشبه	Closely related agents
مستدمية نظ ة الط ية	Haemophillus paragallinarum
مستد ة الط ية	Haemophilw gallinrum
مستضدات ا فظة	Capsular antigen
مستعمرة	Colony
مستنبت صناعي	Artificial media
مسح	Screening
مسحات السحب	Drag swabs
مسحات ا مع	Cloacal swabs
مسحات كا ي	Calgiswabs
مسحات معية	Cloacal swabs
مسحات اطية	Meconium swabs
مسحات مهبلية	Vaginal swabs
مسحات وقطاعات	Smears and sections
مشاكل مرضية متصلة	Related disease problems
مصادر القلق	Troubleshooting
مصل مضاد	Antiserum
مصلي	Serologic
مضاد مناعي للجنس ا قترن ا خفف	Diluted antispecies conjugate
مطثية كولينوم	Clostridium colinum
معامل الإمراضية با قن ا خي	Intracerebral pathogenicity index (ICPI)

معامل الإمراضية با قن الوريدي	Intravenous pathogenicity index (IVPI)
معاملات مسبقة للنسيج	Tissue pretreatments
معايرة الطرق	Standardization of procedures
معايرة ا علقات البيولوجية	Titration of biological suspensions
معزولات	Isolates
معمل ا دمات البيطرية القومي	National veterinary service laboratory
معوية	Intestinal
مغذية تتراثيونات	Tetrathionate enrichment
مغذية سيلينايت	Selenite enrichment
مغذية منتقاة	Selective enrichment
مفضلة	Preferred
مفقسات	Hatcheries
مقابل	Versus
مقارنة انتقالية	Phase-contrast
مقارنة تداخلية	Interference-contrast
مقاومة الأس ا يدروجي	Resistance to pH
مقدمة	Introduction
مكان التكاثر	Site of replication
مكور سبحي	Streptococcus zooepidemicus
مكور عنقودي	Staphylococcus hyicus
مكونات	Ingredients
ملخص	Summary
رضات	Pathogens
منظم	Buffer
منظور تار ي	Historical perspective
منع تلازن الدم	Hemagglutination-inhibition
مواد	Substrates

موزع	Dipenser
موصى ا	Recommended
ميكروب البوردتيلا	Bordetellosis
ميكروب الذئبة ا مراء	Erysiplepthrix rhusiopathae
ميكروب الزهري الكاذب	Pseudospirochetes
ميكروب السل بـ ا لموي	Mycobacterium intercellulare
ميكروب اليارسينيا أو السل الكاذب	Yersinia pseudotuberculosis
ميكروب بوريليا أنسرينا	Borrelia anserine
ميكروب ليستريا	Listeria monocytogenes
ميكروبات ا تدثرة	Chlamydial organisms

ن

نتائج	Results
نتائج مرجعية	Referral issues
نتر الرأس بشدة	Snicking
نشاط التلازن الدموي	Hemagglutinating activity
نقيع ا خ والقلب	Brain heart infusion
نواة داخلية	Endonenous nucleases
نوع جي هـ	Genotype E
نوعية العطيفة	Speciation of campylobacters
نوفوبيوس	Novobiocin

هـ

هستوكيميائية مناعية	Immunohistochemical
هضم بإنز إندونيوكلياز	Endonuclease digestion

و

وحدات معدية	Infectious units

ي

يارسينيا السل الكاذب	Yersenia pseudotuberculosis

ثانياً: إ ليزي – عر

A

American Association	الا اد الأمريكي
AC-ELISA	إليزا جاذبة ا ستضد
Acid fast smears	صبغات الصمود ا مضي
Adenovirus-associated paroviruses	ف وسات بارفو ا صاحبة للأدينو
Adenovirus infection	إصابة بف وس أدينو
Aflatoxicosis	تسمم بالأفلاتوكس
Agar	آجار
Agar gel immunodiffusion	اختبار الانتشار ا ناعي الآجار
Agar gel preciptin (AGP) test	اختبار الترسيب الآجار
Agent	مسبب مرضي
Albumin	زلال البيض
Allanotic sac inoculations	حقن الكيس السقائي
Alpha herpes virus	ف وس ألفا ه بس
Alpha herps virinae	ت عائلة ألفا ه بس
Amniotic sac inoculation	حقن الكيس الأمي
Amplified	مك
Anatipestifer syndrome	متلازمة أناتيبستفر
Animal inoculation	حقن حيوانات التجارب
Antibiotic solution	لول ا ضاد ا يوي
Antigen binding	ربط أنتيج
Antigen capture	جذب الأنتيج
Antigen detection systems	أنظمة كشف مولد الضد (الأنتيج)
Antigen preparation	ض الأنتيج
Antiserum	مصل مضاد
Aplastic anemia	فقر ا لايا الأمية للدم

Arbo virus infection	إصابة بفـ وس آربو
Archiving	تدوين
Argas arboreus	قراد لـ من جنس أرجاس
Argas persicus	قراد لـ من جنس أرجاس
Argas sanchezi	قراد لـ من جنس أرجاس
Arginine dihydrolase	إنز التحلل ا ائي للأرجنـ
Artificial media	مستنبت صناعي
Aspergillas	فطر الرشاشيات
Aspergillosis	إصابة بفطر الرشاشية
Aspergillus fumigatus	رشاشية متبخرة
Astroviruses	فـ وسات ـمية
Asymptomatic	عد الأعراض
Avian campylobacters	عطيفة الطيور
Avian encephalomyelitis	التهاب ا خ الط ي (الارتعاش الوبائي)
Avian influenza	إنفلونزا الطيور
Avian intestinal cells	خلايا أمعاء الطيور
Avian intestinal spirochetes (AIS)	زهري معوي
Avian leukosis	ليكوسيس الطيور
Avian paramyxoviruses	فـ وسات باراميكسو الطيور
Avian pathologests	متخصصي أمراض الطيور
Avian rhinotracheitis	التهاب الأنف والقصبة ا وائية الط ي
Avipoxvirus	فـ وسات جدري الطيور

B

Background	خلفية
Bacteria and mycoplasma	بكتـ يا وميكوبلازما
Balanced salt solutions (BSS_s)	اليل ا لح ا تزنة
Basic fuchsin	فوكسـ قاعدي
Biochemical	بيوكيميائي

Biopsy	حي
Blocking	توقيفية
Bordetella avium	بكت يا بوردتيلا الطيور
Bordetellosis	ميكروب البوردتيلا
Borrelia anserine	ميكروب بوريليا أنسرينا
Botulism	تسمم طثية بوتيلنيوم
Brain heart infusion	نقيع ا خ والقلب
Broths	شوربة
Bubbles	فقاقيع
Budgerigar fledgling disease	مرض أفراخ الببغاوات
Budgerigars	ببغاوات
Buffer	منظم

C

Cage housing	بيوت الأقفاص
Calculation of titers	حساب ا عيار
Calgiswabs	مسحات كا ي
Campylobacter coli	عطيفة قولونية
Campylobacter fetus	عطيفة جنينية
Campylobacter jejuni	عطيفة صامدة
Campylobacter lari	عطيفة لاري
Campylobacteriosis	إصابة بالعطيفة
Candida albicans	فطر ا مـ ة البيضاء
Candida tropicalis	مبيضة استوائية
Candidiasis	إصابة با بيضة
Capsular antigen	مستضدات ا فظة
Carpodacus mexicanus	عصاف ا ل
Cases	حالات
Cell	خلية

Cell-associated virus	ف وس مرتبط با لية
Cell-culture techniques in virology	تقنيات مزرعة ا لية علم الف وسات
Cell-free virus	ف وس حر أو غ مرتبط با لية
Characteristics	صفات
Chick embryo kidney (CEK) cell culture	مزارع خلية كلية أجنة الدجاج
Chicken anemia agent	عامل أنيميا الدجاج
Chicken anemia virus (CAV)	ف وس أنيميا الدجاج
Chicken embryo susceptibility	قابلية جن الدجاج للإصابة
Chicken embryos	أجنة الدجاج
Chicken inoculation	حقن الدجاج
Chicken kidneys (CK) cell culture	مزارع خلية كلية الدجاج
Chlamydia psittaci	متدثرة ببغائية
Chlamydial organisms	ميكروبات ا تدثرة
Chlamydiosis	إصابة با تدثرة
Chocolate blood agar	آجار الدم ا عامل حرارياً
Chopped meat-glucose-starch	قطع اللحم مع ا لوكوز والنشا
Chorioallantoic membrane inoculation	حقن الغشاء الكوريوالانتويس
Classification	تقسيم
Clinical	إكلينيكي
Cloacal swabs	مسحات ا مع
Closely related agents	مسببات مرضية قريبة الشبه
Clostridial diseases	أمراض ا طثيات (الكلوستريديوم)
Clostridium colinum	مطثية كولينوم
Coagulase	لط إنز ي
Colibacillosis	إصابة بالإيشريشيا القولونية
Colisepticaemia	تسمم دموي قولو
Collection	ع

English	العربية
Colony	مستعمرة
Columbia CAN agar	آجار كولومبيا
Commercial kit reagent	أطقم ارية
Competitive	تنافسية
Competitive ELISA	إليزا تنافسية
Complement fixation	تثبيت ا تمم
Confirmation	تأكيد
Control and vaccination	سيطرة و ـص
Coomassiebrilliant blue R	صبغة كوماسي الزرقاء
Coronaviridae	عائلة الف وسات التاجية
Coronaviruses	ف وسات تاجية
Coverslips	أغطية زجاجية
Cross challenge studies	دراسات الإعداء التصال
Culture in embryonating eggs	زرع بيض الأجنة
Culture media	أوساط الزرع
Cytopathic effect	تأث مرضي خلوي
Cytotoxins	وم خلوية

D

English	العربية
Dactylaria gallopava	فطر داكتيلاريا جالوبافا ا ب للحرارة
Dactylariosis	إصابة بالداكتيلاريا
Decontamination	تطه
Detect AIV antigen	كشف أنتيج ف وس إنفلونزا الطيور
Detection	كشف
Dextrose starch agar	آجار الدكستروز والنشا
Diameter of the virion	قطر الف وس
Differentiation	تفريق
Diluted antispecies conjugate	مضاد مناعي للجنس ا قترن ا خفف
Dilutions	فيفات

Dipenser	موزع
Disease	مرض
Disk diffusion test	اختبار الانتشار بالقرص
DNA hydrolysis	لل دي إن إيه
DNA probe hybridization	مسبار ا امض النووي دي إن إيه
DNA-DNA hypridization	ﺟ ا امض النووي الديوكسي ريبوزي
Dot-blot hyperdization	ﺟ اللطخ النقطي
Double-immunodiffusion	الانتشار ا ناعي ا زدوج
Drag swabs	مسحات السحب
Duck embryos	أجنة البط
Duck hepatitis	التهاب كبدي البط
Duck hepatitis virus type I	ﻓ وس الالتهاب الكبدي النوع الأول
Duck hepatitis virus type II	ﻓ وس الالتهاب الكبدي النوع الثا
Duck hepatitis virus type III	ﻓ وس الالتهاب الكبدي النوع الثالث
Duck septicemia	تسمم دموي البط
Duck virus enteritis	التهاب أمعاء البط الف وسي (طاعون البط)
Ducklings	فراخ البط أو البط الصغ
Dust	أتربة

E

Eastern equine encephalitis	ﻓ وسات التهاب ا خ ا يلي الشرقي
EDS 76 virus	ﻓ وس متلازمة ا فاض البيض
Egg culture	زراعة البيض
Elementary body agglutination	تلازن ا سم البدائي
Embryo inoculation	حقن جني
Endonenous nucleases	نواة داخلية
Endonuclease digestion	هضم بإنز إندونيوكلياز
Enteric viruses	ﻓ وسات معوية
Enterobacter	بكت يا معوية

Enteroviruses	ف وسات معوية
Enterovirus-like particle	جزيئات شبيهة الف وس ا عوي
Enumerative response	استجابة عددية
Environmental	بيئية
Environmental monitoring	رصد بيئي
Enzyme-linked fluorescent immunoassay	اختبار التألق ا ناعي الإنز ي
Enzyme-linked immunosorbent assays	إليزا
Erysipelas	ذئبة راء
Erysiplepthrix rhusiopathae	ميكروب الذئبة ا مراء
Escherichia coli	إشريكية قولونية
Essential	أساسي
Essential lipid	دهون أساسية
Evaluation	تقييم
Features	خصائص
Feed	عليقة

F

Fibrinoheterophillic blepharitis	مسبب لالتهاب العيون الفي ي
Filtration	ترشيح
Floor litter	فرشة الأرضية
Fluorescent antibody test	اختبار الأجسام ا ناعية ا تألقة (التألق ا ناعي)
Fluorescent-antibody	تألق مناعي
Fluorochrome stain	صبغة فلوروكروم
Focus	بؤرة
Freezing of cells	ميد ا لايا
French molt	سقوط الريش
Fusarium	جنس فطري مغز
Fusion protein	برو التلاحم أو الاندماج

G

English	العربية
Gangrenous dermatitis	التهاب ا لد الغرغري
Gell-precipitin	ترسيب ا لام
Genome electrophero typing	تصنيف ا بواسطة الفصل الكهربائي
Genotype E	نوع جي هـ
Geometric mean	متوسط هندسي
Giant cell syncytia	مدمج خلايا عملاقة
Gliotoxin	وم جليوتوكس الفطرية ا ثبطة للمناعة
Glycerol saline	لول ا لح ا ضاف إليه ا لسرول
Glycopeptides	ببتيدات نشوية
Glycoproteins	بروتينات نشوية
Goose parvovirus (Derzsy's disease)	ف وس بارفو الإوز (مرض ديرزي)
Gross lesions	آفات عينية
Growth requirements	متطلبات النمو

H

English	العربية
Haemophillus paragallinarum	مستدمية نظ ة الط ية
Haemophilw gallinrum	مستد ة الط ية
Handling	تداول
Harvesting the CAM	ع الغشاء الكوريو السقائي
Hatcheries	مفقسات
Hatchings	صيصان فاقسة
Hazards	خطورة
Hemagglutinating activity	نشاط التلازن الدموي
Hemagglutination-inhibition	منع تلازن الدم
hematocrite value	قيمة أو مستوى خلايا الدم ا مراء
Hemorrhagic enteritis of turkeys	التهاب معوي نز الرومي
Herpesviridae	عائلة ه بس
Herpesvirus of free-living and pet birds	ف وسات ه بس الطيور الطليقة وا لية

Herring bone — عظام لك الر ة

Hippurate hydrolysis — لل ا يبيورات

Histopathology — فحص نسيجي مرضي

Historical perspective — منظور تار ي

Holding media — أوساط حاملة

Host — عائل

hot-start PCR — تفاعل البلمرة بالبداية الساخنة

Human — إنسان

Human parainfluenza virus — ف وس نظ الإنفلونزا الإنسان

I

Identification — تعريف

Identified — ا تعرف عليها

Immune electron microscopy (IEM) — هر إلكترو مناعي

Immunoassay — ليل مناعي

Immunohistochemistry — كيمياء الأنسجة ا ناعية

Immunohistologic staining — صبغ نسيجي مناعي

Immunological techniques — تقنيات مناعية

Immunoperoxidase — إنز ب وكسيديز ا ناعي

In situ hyperdization — ج موضعي نسيجي

Incubation — ض

Infectious bronchitis — التهاب شع معدي

Infectious bursal disease — مرض الب سا ا عدي

Infectious coryza — زكام معدي

Infectious laryngotracheitis — التهاب ا نجرة والقصبة ا وائية ا عدي

Infectious serositis — التهاب الأغشية ا صلية ا عدي

Infectious units — وحدات معدية

Ingredients — مكونات

Initial — أو

Interference-contrast	مقارنة تداخلية
Interpretation	تقييم وتفسر
Intestinal	معوية
Intestinal spirochetosis	زهري معوي
Intracerebral inoculation	حقن داخل ا خ
Intracerebral pathogenicity index (ICPI)	معامل الإمراضية با قن ا خي
Intracoloacal pathogenicity test	اختبار الضراوة با قن ا مع
Intranuclear inclusions	أجسام احتوائية داخل الأنوية
Intravenous pathogenicity index (IVPI)	معامل الإمراضية با قن الوريدي
Introduction	مقدمة
Isolates	معزولات

K

Killed-virus vaccine	لقاح ف وس ميت

L

Laboratory diagnosis	تشخيص معملي
Laboratory safety	أمان ا عمل
Lactoalbumin hydrolysate	زلال اللاكتوز ا تحلل
Latex agglutination	اختبار تلازن اللاتكس
Lentogenic virus	ف وس قليل الضراوة
Leukosis/Sarcomas	ليكوسيس/ساركوما (تكثر نسيج البيض)
limber neck	رقبة رخوة
Listeria monocytogenes	ميكروب ليستريا
Listeriosis	إصابة يكروب ليست يا
Litmus milk	حليب عباد الشمس
Lymphocyte cultures	مزارع ا لية الليمفاوية
Lyophilyzation	فيد
Lysine decarboxylation	إزالة موعة كربوكسيل من ا مض الأمي لايس
Lysine iron agar	آجار حديد الليس

M

Malabsorption	ضعف الامتصاص
Mannitol-salt agar	آجار ملح ا انيتول
Marble spleen disease of pheasants	مرض الطحال ا رمري الفزان
Marek's disease (MD)	مرض مارك
Mean death time	متوسط زمن النفوق
Meconium swabs	مسحات اطية
Media	أوساط
Mesogenic virus	ف وس متوسط الضراوة
Microplates	أطباق دقيقة
Microscopic lesions	آفات هرية
Minimal	أد
Molecular assessment of pathogenicity	تقييم جزيئي للضراوة
Monitoring	رصد
Motility	حركة
Mucopolysaccharides	عديد السكريات ا خاطية
Multilocus enzyme electrophoresis	فصل كهر للإنز عديد ا واقع
Mumps virus	ف وس الغدة النكافية
Mycobacterium avium	متفطرة ط ية
Mycobacterium intercellulare	ميكروب السل ب ا لوي
Mycoplasmosis	إصابة يكوبلازما
Mycoses and mycotoxicosis	إصابة بالفطريات والتسمم الفطري
Mycotoxicoses	تسمم فطري

N

Nalidixic acid sensitivity	حساسية ض النالاديكس
National veterinary service laboratory	معمل ا دمات البيطرية القومي
ND virus APMV-1	ف وس مرض النيوكاسيل
Necrotic enteritis	التهاب معوي تنكرزي

English	العربية
Neotetrazolium	صبغة كلوريد نيوتترازوليم
Nest boxes	أقفاص العش
Nested primer	بادئ عشي
Neutral red solution	لول ا تعادل الأ ر
New duck disease	مرض البط ا ديد
Newcasle disease	مرض نيوكاسيل
Newcastle disease	مرض نيوكاسيل
Newcastle disease virus	ف وس مرض النيوكاسيل
Niacin production	إنتاج النياسـ
Ninhydrin reagent	كاشف ننهيدرين
Nitrate reduction	اختزال النيترات
Nonbudgerigar psittacine birds	طيور الزينة من غ البغاوات
Non-producer cell activation test	اختبار تنشيط ا لية غ ا نتجة
Nonsatellitic bacteria	بكتريا غ مصاحبة
Non-selective media	أوساط غ ا نتقاة
Novobiocin	نوفوبيوسـ
Nucleic acid	ض نووي
Nucleic acid probes	مسابـ الأ اض النووية
Nucleic acid sequencing	تتابع ا مض النووي

O

English	العربية
Ochratoxicosis	تسمم بالأوكراتوكسـ
Oncorna viruses	ف وسات سرطانية
One-day-old	عمر يوم
Opaque plaques	بقع معتمة
Organ tissue culture	مزرعة الأنسجة العضوية
Ornithobacteriosis	إصابة بالبكتـ يا الأنف قصبية الطـ ية
Ornithobacterium rhinotracheale (ORT)	بكتـ يا الطـ ية الأنف قصبية
Oxidase	أنز أكسيديز

Oxidase reaction	تفاعل أوكسيديز

P

P. gallinarum infection	عدوى باست يللا جلين م الطيور
P. multocida infection	عدوى الباست يللا ملتوسيدا
Papovaviridae	عائلة ف وسات بابوفا
Paraffin sections	قطاعات البارافـ
Passage of cell cultures	ـرير مزارع ا لية
Passive hemagglutination	اختبار التلازن الدموي السلـ
Passive hyperemia	فرط الدم ا نفعل
Pasteurella haemolytica	باست يللا ا للة للدم
Pasteurellosis	إصابة بالباست يللا
Pathogenicity	إمراضية
Pathogenicity determination	ـديد الضراوة
Pathogens	ـرضات
Pathotypes	أنواع ـرضة
Phage typing	ف وس بكت ي
Phase-contrast	مقارنة انتقالية
Phenotypic mixing test (PM)	اختبار خلط الأ اط الشكلية
Phosphate-buffered saline (PBS)	ـلول ملح الفوسفات ا نظم
Picorna viruses	ف وسات بيكورنا
Pipetting	عملية ا ص
Planting media	أوساط الزرع
Plaque formation	تكوين البقع
Plaque reduction tests	اختبارات تناقص البقع
Plaques assay	قياس تكوين البقع
Plate surface contamination	تلوث سطح الطبق
Plating media	أوساط الزرع
Pnemovirus	ف وس رئوي

English	العربية
Polymerase chain reaction	تفاعل البلمرة ا تسلسل
Polymorphic DNA analysis	ض نووي دي إن إيه متعدد الأشكال
Polyomavirus infections	إصابات ف وس بوليوما
Polysersitis	أغشية مصلية
Poultry flocks	قطعان الدواجن
Pout enteritis mortality syndrome	متلازمة الالتهاب ا معوي والنفوق الرومي
Pox	مرض ا دري
Poxviridae	عائلة ف وسات ا دري
Precautions	احتياطات
Pre-enrichment	ما قبل ا غذية
Preface	تقد
Preferred	مفضلة
Preparation of HI antigen	ض الأنتيج ا ثبط لتلازن الدم
Primary capture antibody	جسم مضاد أو جاذب
Principles	أساسيات
Probe selection	اختيار ا سبار
Prozone	تأث مكا
Pseudospirochetes	ميكروب الزهري الكاذب
Pseudotuberculosis	عدوى السل الكاذب
Psittacine beak and feather disease	مرض ا نقار والريش البغاوات

Q

English	العربية
Quail disease	مرض السمان
Qualitative	كيفية
Quality control	مراقبة ا ودة
Quantal assays	ليل كمي
Quantitative	كمية

R

English	العربية
Radial immuno diffusion	فصل مناعي قطري

Random	عشوائي
Rapid	سريع
Rationale for using	غرض الاستخدام
Reactors	متفاعلات
Recognition of growth	إدراك النمو
Recommended	موصى ا
References	مراجع
Referral issues	نتائج مرجعية
Reimerella anatipestifer	را يللا أناتيبستفر
Related disease problems	مشاكل مرضية متصلة
Reoviruses	ف وسات ريو
Replica plating	تقنية الفرد الطبقي الناسخ
Reporting	تسجيل
Resistance to pH	مقاومة الأس ا يدروجي
Resistance-inducing factor test	اختبار العامل ا سبب للمقاومة
Respiratory syncytialvirus	ف وس رئوي
Response	استجابة
Restriction endonuclease	ليل القصر الإنز ي الطر
Restriction endonuclease analysis	ليل القطع الإنز ي للحامض النووي
Restriction fragment length polymorphism	تعدد طول القطعة القصري
Restriction fragment length polymorphrism	تفاوت طول القطع الوراثية
Results	نتائج
Reticuloendotheliosis	ريتيكلوإندوثيليوسيس (شباك بطاني)
Reverse transcriptase	طريقة النسخ العكسي
Riemerella anatipestifer	را يلا أناتيبستفر
Ringworm (favus)	سعف أو قراع
Ripotyping	تصنيف ريبوزي

English	العربية
Rolling reactions	تفاعلات ملتفة
Rota virus	ف وس روتا
Rous sarcoma virus-focus reduction	اختزال بؤرة ف وس راوس ساركوما
Routes of inoculation	طرق ا قن

S

English	العربية
Safranin	صبغة سافران
Salmonella	سا ونيلا
Salmonella enteritidis	سا ونيلا إنتريتيدس
Salmonella gallinarum	سا ونيلا الط ية
Salmonella pullorum	سا ونيلا بللورم
Salmonellosis	إصابة يكروب السا ونيلا
Samples	عينات
Satellitic bacteria	بكت يا مصاحبة
Screening	مسح
Selective enrichment	مغذية منتقاة
Selective media	بيئات منتقاة
Selenite enrichment	مغذية سيلينايت
Sensitivity	حساسية
Sentinel birds	طيور كاشفة
Septicemic borreliosis	الإنتان الدموي يكروب بوريليا
Sera	أمصال
Serologic	مصلي
Serological typing	التصنيف ا صلي
Serotyping	تصنيف مصلي
Shipping	شحن
Significance	أ ية
Signs	أعراض
Site of replication	مكان التكاثر

English	العربية
Small enteric viruses	ف وسات معوية صغ ة
Smears and sections	مسحات وقطاعات
Snicking	نتر الرأس بشدة
Solvent	مذيب
Souther blot hybridization	شف جي شرقي
Speciation of campylobacters	نوعية العطيفة
Specimens	عينات
Spiking mortality	متلازمة النفوق الشوكي
Spirochaetales	رتبة اللولبيات
Spirochetosis	إصابة باللولبيات (زهري الطيور)
Splenomegally	تضخم الطحال
Staining	صبغ
Standardization of procedures	معايرة الطرق
Staphylococcosis	إصابة با كور العنقودي الذه
Staphylococcus hyicus	مكور عنقودي
Steps	خطوات
Sterilization	تعقيم
Sternal bursa	حوصلة القصية
Storage	حفظ
Strain variation	تباين العترة
Streptococcosis	الإصابة با كور السبحي
Streptococcus zooepidemicus	مكور سبحي
Stunting syndrome agent (SSA)	عامل متلازمة التقزم
Substrates	مواد
Subtype	ت نوعي
Sulfadiazine	سلفا ديازين
Sulfapyridine	سلفا ب يدين
Summary	ملخص

Supplemended	مدعم
Surface lipopolysaccarides	دهون عديدة السكريات السطحية
Susceptibility test agar	آجار اختبار القابلية
Swollen head syndrome	متلازمة الرأس ا نتفخ
Symmetry of the nucleocapsid	اثل الكابسيد النووي

T

Taxonomy	تقسيم
Techniques	تقنيات
Tellurite reduction	اختزال التيللورايت
Temperatures	درجات ا رارة
Tenosynovitis	التهاب غمد الأوتار
Tetrathionate enrichment	مغذية تتراثيونات
Thermal stability	ثبات حراري
Thymus	غدة توتية
Time	الزمن
Tissue culture	زرع نسيجي
Tissue pretreatments	معاملات مسبقة للنسيج
Titration of biological suspensions	معايرة ا علقات البيولوجية
Tracheal organ	عضو القصبة ا وائية
Transmission electron microscopy	هر إلكترو النافذ
Trichophyton gallinae	شعروية ط ية
Trichothecene	تسمم بالترايكوثيس
Triple sugar iron agar	آجار ا ديد ثلاثي السكر
Troubleshooting	مصادر القلق
Trypsin and versene (TV) solution	لول التربس والف س
Trypticase soy agar	آجار الصويا
Tryptose phosphate broth (TPB)	شوربة فوسفات التربتوز
Tuberculosis	مرض السل

Tumors	أورام
Turkey meningoencephalitis	التهاب ا خ السحائي الرومي
Turkey rhinotracheitis	ف وس الالتهاب الأنف قص الرومي
Turkey virus hepatitis	التهاب الكبد الف وسي الرومي
Tween-80 hydrolysis	لل توين-٨٠
Types of infectivity assays	أنواع التأث ات الإمراضية
Typical gas chromatogram	بيان لو وذجي للغاز

U

Ulcerative enteritis	التهاب معوي تقرحي
Urease	إنز لل اليوريا

V

Vaccine delivery	طلب اللقاح
Vaccine strains	عترات اللقاح
Vaginal swabs	مسحات مهبلية
Velogenic virus	ف وس عا الضراوة
Versus	مقابل
Vibrio	إصابة يكروب شبيه الواوي
Viral antigen	أنتيج ف وسي
Viral arthritis	التهاب ا فصل الف وسي
Virus neutralization	تعادل ف وسي
Virus propagation in embryonating eggs	تكاثر الف وس أجنة البيض
Visual	مرئي

W

Western duck sickness	اعتلال البط الغر
Whole blood plate test	اختبار الشر ة ا صلي السريع

Y

Yersenia pseudotuberculosis	يارسينيا السل الكاذب
Yersinia pseudotuberculosis	ميكروب اليارسينيا أو السل الكاذب
Yolk sac inoculation	حقن كيس ا ح



كشاف الموضوعات

ب

ت

ج

ف

ق

ك

ن

ي